

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PRODUÇÃO
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PRODUÇÃO

FRANCIELLI CASANOVA MONTEIRO

AVALIAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* COMO CONTROLE DE QUALIDADE
NO PROCESSAMENTO DE CARNES

DISSERTAÇÃO

PONTA GROSSA

2015

FRANCIELLI CASANOVA MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* COMO CONTROLE DE QUALIDADE
NO PROCESSAMENTO DE CARNES**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Produção, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Ponta Grossa, Área de Concentração: Gestão da Inovação Agroindustrial - GIA.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Vitória Messias Bittencourt

PONTA GROSSA

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo Departamento de Biblioteca
da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa
n. 21/15

M775 Monteiro, Francieli Casanova

Avaliação de *listeria monocytogenes* como controle de qualidade no processamento de carnes. / Francieli Casanova Monteiro. -- Ponta Grossa, 2015.

101 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Vitória Messias Bittencourt

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2015.

1. Matadouros. 2. Contaminação microbiana. 3. *Listeria monocytogenes*. 4. Sequenciamento de nucleotídeo. 5. Reação em cadeia de polimerase. I. Bittencourt, Juliana Vitória Messias. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. III. Título.

CDD 670.42



Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE PRODUÇÃO**



FOLHA DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação Nº 272/2015

**AVALIAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* COMO CONTROLE DE QUALIDADE DO
PROCESSAMENTO DE CARNES**

por

Francieli Casanova Montelro

Esta dissertação foi apresentada às 14 horas de 06 de março de 2015 como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, com área de concentração em Gestão Industrial, linha de pesquisa em Gestão Industrial, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção. O candidato foi argüido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo citados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dra. Juliana Inaba (UEPG)

Prof. Dra. Sabrina de Avila Rodrigues
(UTFPR)

Prof. Dra. Juliana Vitoria Messias
Bittencourt (UTFPR) – Orientador

Prof. Dr. Aldo Braghini Junior (UTFPR)
Coordenador do PPGE

A FOLHA DE APROVAÇÃO ASSINADA ENCONTRA-SE NO DEPARTAMENTO DE
REGISTROS ACADÊMICOS DA UTFPR –CÂMPUS PONTA GROSSA

*À você meu marido,
João Frederico Monteiro
que sempre me ajudou nos dias mais difíceis,
com muito carinho e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por tudo, principalmente por me permitir ser muito mais do que eu sempre sonhei.

Ao meu marido, João Frederico Monteiro, por estar ao meu lado todos os dias, me incentivando e mostrando que a vida científica/acadêmica vale a pena, apesar de todos os percalços. Obrigada por existir e tornar a minha caminhada mais feliz, amo você!

Aos meus pais, Marilene e Antônio, que me ensinaram a ter garra e não desistir nas primeiras dificuldades.

À minha Professora e orientadora, Juliana V. M. Bittencourt, pela amizade, paciência, por todos os conhecimentos passados e principalmente pela confiança. Com certeza, um exemplo de vida para mim.

À colega de laboratório de Bioengenharia, Renata Samulak, pelo auxílio no início da pesquisa, e por abrir as portas do abatedouro-frigorífico para realização das amostragens.

À Mariana Fidelis, pela ajuda na interpretação dos resultados.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, especialmente à Caroline Andrade, por toda ajuda nas análises de sequenciamento.

À Prof^a Maike Montanhini, que dedicou seu tempo para me auxiliar e tanto contribuiu neste trabalho.

À minha amiga Alcione Lino, companheira de mestrado e agora da vida. Você fez diferença em muitos momentos, sem a sua presença teria sido muito mais difícil.

À minha amiga Flavia Henrique, por ser um exemplo de determinação, me incentivar e me fazer rir em tantos momentos durante o último ano de mestrado. Você é muito especial irmã...

Aos meus grandes amigos do CTG Porteira dos Municípios, por inúmeros momentos compartilhados, obrigada por estarem presentes nesse momento tão importante de minha vida. Vocês são os irmãos que a vida me permitiu escolher!!!

Aos amigos Mary, Tafaél, Amanda, Jullie e Larissa, pela amizade, convívio, carinho e incentivo.

Ao PPGEP, pela oportunidade, em especial ao Cesar, que não mediu esforços para me auxiliar sempre que precisei.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À todos os colegas e professores que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A produção de carne suína no Brasil tem dado um grande salto nos últimos anos, no seu aspecto quantitativo e qualitativo. Isso permitiu posicionar o Brasil dentre os principais atuantes mundiais no setor da suinocultura. A garantia da inocuidade de alimentos depende da capacidade das indústrias em minimizar a contaminação de alimentos por microrganismos patogênicos, principalmente durante o processamento e estocagem, e controlar para que a garantia continue sendo mantida. Dentre os patógenos existentes, destaca-se *Listeria monocytogenes* que é um importante patógeno de origem alimentar emergente e causadora de infecções localizadas e generalizadas, levando o indivíduo ao óbito. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade sanitária do processo produtivo de um abatedouro-frigorífico de suínos, quanto à presença de *L. monocytogenes*. Inicialmente foram padronizados os métodos para aplicação da PCR e análise de sequenciamento posteriormente aplicado nas amostras coletadas. Duas coletas foram realizadas em um frigorífico que abate suínos localizado na região dos Campos Gerais – PR. Também verificou-se os prazos e custos apresentados por laboratórios particulares brasileiros, fazendo uma comparação com a técnica molecular. A quantidade de amostras positivas da segunda coleta foi superior em relação a primeira, 10 e 3 respectivamente. Com o sequenciamento foi possível observar que a origem da contaminação encontra-se no setor de triparia. Também foi possível verificar que poucos laboratórios possuem a PCR como método de diagnóstico, e provou-se ainda que a técnica pode ser uma ótima alternativa por se apresentar econômica e viável para indústria de carnes.

Palavras-chave: abatedouro de suínos, contaminação, *Listeria sp*, sequenciamento de DNA, PCR.

ABSTRACT

The production of pork in Brazil has taken a great leap in recent years, in quantitative and qualitative. This allowed position Brazil among the main active worldwide in the field of pig farming. The guarantee of the safety of food depends on the ability of industries to minimise the contamination of food by pathogenic micro-organisms, especially during processing and storage, and to ensure that the guarantee will continue to be maintained. Among the existing pathogens, stands out *Listeria monocytogenes*, which is an important pathogen of food origin emerging and causing localized infections and generalized, leading the individual to death. In this sense, the objective of this study was to evaluate the health quality of the production process from an abattoir-fridge of pigs, as the presence of *L. monocytogenes*. Initially were standardized methods for the application of PCR analysis and sequencing of subsequently applied in the samples collected. Two samples were collected in a fridge that slaughter pigs located in the region of Campos Gerais - PR. Also it was found that the deadlines and costs presented by private laboratories Brazilians, making a comparison with the molecular technique. The number of positive samples of seunda collection was superior to that of the first, 10 and 3 respectively. With the sequencing was possible to observe that the source of contamination is in the sector of triparia. It was also possible to observe that few laboratories have the PCR as a method of diagnosis, and it has been proved that the technique can be a great alternative to present economic and feasible for meat industry.

Keywords: slaughter of pork, contamination, *Listeria* sp., quality programs, PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma dos locais amostrados na coleta 1	33
Figura 2-Fluxograma dos locais amostrados na coleta 2	35
Figura 3- Resultado de análise de PCR nos pontos 19, 20 e 21	41
Figura 4- Resultado da análise de PCR nos pontos amostrados na segunda coleta	44
Figura 5- Alinhamento das sequencias de DNA.....	50
Figura 6- Árvore filogenética proveniente do sequenciamento.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Primers utilizados na reação da PCR para <i>Listeria monocytogenes</i> 37	
Tabela 2- Resultados demonstrando presença de <i>L.monocytogenes</i> em ambiente produtivo de abatedouro-frigorifico através da Técnica de PCR	43
Tabela 3- Comparação de valores e tempo propostos por Laboratórios Particulares	53
Tabela 4- Levantamento de custos dos reagentes utilizados para extração de DNA e reação de PCR.....	55
Tabela 5- Valores totais de custos de extração de DNA e reação de PCR....	55

LISTA DE SIGLAS

APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BPF	Boas práticas de fabricação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
LEB	Caldo de enriquecimento de Listeria
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NaNO ₃	Nitrato de sódio
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPHO	Procedimento Padrão de Higiene Operacional
SIP	Serviço de Inspeção do Paraná
POA	Produtos de Origem Animal
TAQ	Taq DNA polimerase
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Problema	14
1.2 Justificativa	15
1.3 Estrutura da Pesquisa	16
1.4 OBJETIVOS	17
1.4.1 Objetivo Geral	17
1.4.2 Objetivo Específico	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Controle de Qualidade na Industria de Alimentos	18
2.2 Contaminação Microbiológico durante o abate	20
2.3 Contaminação microbiológica no processamento de carnes	22
2.4 <i>Listeria sp</i>	24
2.5 Listeriose em Humanos	27
2.6 Método de diagnóstico de patógenos	28
2.7 Análises Moleculares	29
3.7.1 PCR	29
3 METODOLOGIA	31
3.1 Classificação da Pesquisa	31
3.2 Local da pesquisa e coleta das amostras	31
3.3 Extração de DNA de <i>Listeria monocytogenes</i>	36
3.4 Reação de PCR	37
3.5 Sequenciamento	38
3.6 Levantamento dos sistemas existentes para diagnósticos de <i>Listeria monocytogenes</i> em laboratórios comerciais	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Extração de DNA de <i>Listeria monocytogenes</i>	41
4.2 Reação de PCR	41
4.3 Análise de <i>L. monocytogenes</i> no processo produtivo de suínos	41
4.4 Identificação genotípica dos isolados a partir de focos de contaminação	50
4.5 Dados do levantamento dos sistemas existentes para diagnósticos de <i>Listeria monocytogenes</i> em laboratórios comerciais	52
5.CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXO A	73
ANEXO B	86

1 INTRODUÇÃO

A produção de carne suína no Brasil tem dado um grande salto nos últimos anos, no seu aspecto quantitativo e qualitativo. Isso permitiu posicionar o Brasil dentre os principais atuantes mundiais no setor da suinocultura.

No panorama nacional, a suinocultura vem adquirindo um destaque importante na produção e na exportação, motivada pela introdução de novas tecnologias no sistema de produção, aumento do consumo interno e conquista do mercado internacional.

A garantia da inocuidade de alimentos depende da capacidade das indústrias em minimizar a contaminação de alimentos por micro-organismos patogênicos, principalmente durante o processamento e estocagem, e controlar para que a garantia continue sendo mantida. Os fatores mais importantes que contribuem para a presença do patógeno nos processos produtivos são a falha na higiene, a contaminação cruzada, o armazenamento inadequados, os equipamentos contaminados e a contaminação por manipuladores.

Condições sanitárias deficientes durante o abate dos animais, cozimento inadequado, armazenamento impróprio e falta de higiene durante o preparo dos produtos cárneos são condições que podem predispor os indivíduos a se contaminarem. Deste modo, medidas no controle de qualidade nesse sistema produtivo são de suma importância. Dentre os controles possíveis, talvez um dos mais importantes seja o microbiológico, que tem o intuito de identificar locais de contaminação que podem fornecer alguns parâmetros sobre a persistência das cepas dentro do ambiente de processamento.

Partindo destas afirmações, surge a seguinte pergunta de pesquisa: De que maneira os métodos moleculares podem atuar como controle de qualidade seguro e eficiente para *L. monocytogenes* em ambientes de abate e de processamento industrial?

A pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos pode ser realizada utilizando-se métodos de cultivo tradicionais seguidos de caracterização bioquímica, ou por meio de técnicas alternativas, como por exemplo a PCR. A

última destaca-se da convencional devido ao curto prazo, sendo uma técnica mais precisa a confirmação do resultado é confiável aliado ao baixo custo.

A contaminação por *L. monocytogenes* é de difícil controle, uma vez que o organismo é ubíquo no ambiente e possui características que permitem sua multiplicação no alimento sob condições usualmente adversas para outras bactérias patogênicas. O grande desafio no controle de *L. monocytogenes* na indústria é a prevenção do estabelecimento da bactéria num nicho específico, onde as rotinas de limpeza e desinfecção possam ser ineficazes, cabendo aos profissionais inseridos, principalmente, na área de Engenharia de Produção esse desafio.

A legislação brasileira não prevê limites de tolerância para a presença de do micro-organismo em carnes e produtos cárneos (BRASIL, 2001). Apesar do grande volume de trabalhos realizados sobre *L. monocytogenes*, não há estudos que estabeleçam a real ocorrência do micro-organismo na carne suína brasileira e que forneçam dados para efetivar medidas de controle específicas na obtenção e processamento da carne. (BARROS, 2004).

No caso específico de *L. monocytogenes*, a análise microbiológica convencional demanda tempo e pode chegar a 14 dias para a sua confirmação, enquanto que o ensaio de PCR pode ser realizado em menos de 24 horas. Diante de lote de exportação ou de um surto de toxinfecção alimentar em que as características da listeriose estejam presentes, a pesquisa convencional torna-se demorada.

As indústrias de alimentos necessitam de metodologias rápidas e sensíveis para monitorar a incidência de *L. monocytogenes*, principalmente em razão do fato das técnicas convencionais de isolamento e identificação deste patógeno, necessitar de etapas trabalhosas e de longa duração, o que muitas vezes pode levar semanas de enriquecimento e de cultivo em meios seletivos, contradizendo a urgência do controle epidemiológico. (REVOLLEDO *et al.* 2009).

Com intuito de obter resultados mais rápidos, eficientes e com maior biossegurança ao analista, já que o exclui a utilização de qualquer tipo de sangue na sua técnica, o diagnóstico por PCR vem sendo apontado como o método mais utilizado como alternativa de otimização no procedimento de

análise nas indústrias. Mesmo com a crescente utilização dos métodos moleculares, e aprovada pela Instrução Normativa nº 41, de 07 de Junho de 2004, do MAPA em pesquisa sobre microbiologia de alimentos na área da Garantia da Qualidade, são escassas as publicações no Brasil que pautem estas técnicas com este campo (BRASIL, 2004).

1.1 PROBLEMA

As infecções alimentares representam, ainda hoje, são um sério problema de sanidade pública pela sua frequência elevada, mortalidade e pelo grande número de micro-organismos que podem estar envolvidos em um simples evento epidêmico. Diversos patógenos alimentares são conhecidos por causarem doenças, estando veiculados a alimentos e água, e entre esses sabe-se que as bactérias constituem um grande grupo de micro-organismos causadores de doenças. Dentre esses patógenos, *Listeria monocytogenes* apresenta grande risco à saúde do consumidor, podendo causar abortos e em alguns casos, levando o indivíduo ao óbito.

L. monocytogenes pode subsistir em locais como câmaras de resfriamento, pela sua capacidade de permanecer viável após repetidos congelamentos e descongelamentos, aderindo às diversas superfícies de contato de alimentos pela formação de biofilmes (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

No Brasil, as informações referentes à vigilância epidemiológica dos casos de listeriose assim como dados relativos ao isolamento de *L. monocytogenes* em alimentos ainda são escassos. Além disso, a legislação brasileira, de acordo com a Resolução no 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que fixa padrões microbiológicos para alimentos, não estabelece nem critério de obrigatoriedade para detecção nem níveis de tolerância de *L. monocytogenes* em alimentos, determinando somente que seja feita pesquisa do patógeno em queijos (BRASIL, 2001).

Marinello (et. al. 2006) descrevem que os métodos tradicionais de detecção de micro-organismos em alimentos, embora confiáveis e eficientes,

requerem de vários dias a semanas antes dos resultados serem obtidos. Os mesmos autores ressaltam que as propriedades fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas podem não ser expressas e quando são, podem ser difíceis de serem interpretadas e classificadas, além da possibilidade de existência de resultados falso-negativos, devido a dificuldade do técnico em executar a análise.

A fim de eliminar ou reduzir os inconvenientes do diagnóstico convencional, métodos alternativos são desenvolvidos para que os tradicionais sejam substituídos ou complementados, (ANDRADE et al. 2010). Dentre as alternativas destacam-se as técnicas da biologia molecular, sendo a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) a mais indicada para a resolução de possíveis imprevistos com os resultados.

1.2 JUSTIFICATIVA

No caso específico de *L. monocytogenes*, a análise microbiológica convencional demanda tempo e pode chegar a 14 dias para a sua confirmação, enquanto que o ensaio de PCR pode ser realizado em menos de 24 horas. Diante de lote de exportação ou de um surto de toxinfecção alimentar em que as características da listeriose estejam presentes, a pesquisa convencional torna-se demorada.

As indústrias de alimentos necessitam de metodologias rápidas e sensíveis para monitorar a incidência de *L. monocytogenes*, principalmente em razão do fato das técnicas convencionais de isolamento e identificação deste patógeno, necessitar de etapas trabalhosas e de longa duração, o que muitas vezes pode levar semanas de enriquecimento e de cultivo em meios seletivos, contradizendo a urgência do controle epidemiológico. (REVOLLEDO et.al. 2009).

1.3 ESTRUTURA DA PESQUISA

A presente pesquisa se divide em cinco sessões. A primeira traz a contextualização e apresentação do tema, o problema, os objetivos, a delimitação e justificativa da pesquisa, demonstrando a necessidade da realização da mesma.

O segundo capítulo apresenta o embasamento teórico, tratando sobre o controle de qualidade na indústria de alimentos, contaminação microbiológica durante o abate e processamento de carnes e derivados, mostrando também dados sobre *Listeria sp* e a doença causada pela mesma. Aborda também os métodos de diagnósticos de micro-organismos patógenos.

Assim, envolve métodos microbiológicos convencionais e recentes aplicados no controle microbiológico de alimentos. Em seguida, há a descrição do diagnóstico molecular sobre a técnica PCR.

No terceiro capítulo estão apresentadas as etapas para a condução da pesquisa, a metodologia, de forma detalhada para que possa ser compreendida e reproduzida, desde a padronização de protocolos de extração de DNA até sua aplicação no ambiente produtivo de carne suína.

O quarto capítulo apresenta os resultados alcançados bem como a discussão dos mesmos, em se tratando de contaminação por bactérias durante o abate de suínos. Também há a uma comparação, de valores e tempo de resultado, entre a análise microbiológica convencional e PCR, apontando as considerações do uso de diagnóstico molecular em relação às técnicas convencionais na detecção de patógenos alimentares.

O último capítulo traz as conclusões da pesquisa apontando uma visão geral sobre *Listeria monocytogenes*, sobre importância do monitoramento do mesmo, enfatizando que outras pesquisas ainda são necessárias para obtenção de dados concretos sobre a presença deste patógeno. Finalizando com a importância da biologia molecular na indústria de alimentos e desafios dos profissionais da Engenharia de Produção a preocupação com a segurança alimentar dos consumidores finais.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo geral

Avaliar a qualidade sanitária do processo produtivo de um abatedouro-frigorífico de suínos, quanto à presença de *Listeria monocytogenes*.

1.4.2. Objetivos específicos

- Aplicar estratégias de detecção molecular de contaminação de *Listeria monocytogenes*;
- Identificar diferentes pontos do processo produtivo de abate quanto à presença de *L. monocytogenes* via PCR;
- Identificar genotipicamente as linhagens de *Listeria monocytogenes*;
- Realizar um levantamento dos sistemas existentes para diagnósticos de *Listeria monocytogenes* em laboratórios comerciais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

A gestão da qualidade é compreendida como a aproximação escolhida e o aglomerado de técnicas usadas para obter-se, de forma eficiente e eficaz, a qualidade esperada para o produto. A gestão da qualidade de uma organização abrange seus procedimentos e se amplia aos fornecedores e clientes, segundo Toledo (1997).

Garvin (1992) conclui que a gestão da qualidade evoluiu, ao longo dos últimos cem anos, em quatro fases, as quais chama de “eras” da qualidade e que são: inspeção, controle estatístico da qualidade, garantia da qualidade e gestão estratégica da qualidade.

a) Verificação: reporta-se ao momento em que a gestão da qualidade se restringia à inspeção dos produtos acabados. Fala-se de um aspecto simplesmente de correção na inspeção do produto pronto, com a finalidade de desmembrar as unidades de não conformidade. Geralmente, a metodologia utilizada não possui embasamento científico.

b) Domínio número da qualidade: diz respeito à área da concepção dos sistemas estatísticos de amostragem e de controle estatístico de processo, dirigidas para o controle da qualidade no processo. O controle do processo é uma prioridade preventiva centralizado na assistência e controle das variações durante o processo que possibilita influenciar na qualidade final do produto. Foi causador de um amplo salto nos padrões de qualidade das organizações e pela alta do controle da qualidade ao status de disciplina científica.

c) Afirmação da qualidade: em se tratando deste era, a gestão da qualidade, de uma disciplina restrita ao “chão de fábrica” ou à produção fabril, adota uma posição mais acentuada no gerenciamento da empresa. Abandona a ideia de ser apenas a execução de métodos estatísticos para preveni-la e o controle da qualidade, adotando um papel de certificar a qualidade em todas os setores e atividades da organização através de sistemas da qualidade. Estes

sistemas de garantia da qualidade estão vinculados a um aspecto relativamente mais vasto e preventivo, que busca, por meio de um gerenciamento sistêmico, garantir a qualidade em todas as etapas do ciclo do produto (da identificação das necessidades ao uso e descarte do produto).

d) gestão ardilosa da qualidade: Nessa etapa, as empresas gerenciam a qualidade de forma proativa como fonte de vantagem competitiva, utilizando-se de um processo de planejamento estratégico para a qualidade e de um amplo conjunto de ações (programas, treinamento, grupos de melhoria, ferramentas de análise e melhoria de processos, qualidade no desenvolvimento do produto, etc.) para atingir os objetivos de satisfação total do cliente. Essa era se concretiza por meio da gestão da qualidade total, que se refere a uma visão de como gerenciar globalmente os negócios com uma visão orientada para a satisfação total do cliente e para a melhoria contínua. É composta por um conjunto integrado de princípios, ferramentas e metodologias que apoiam a melhoria contínua dos produtos e processos.

O progressivo cuidado em que o tema qualidade de alimentos tem despertado é evidente e, simultaneamente, diversas ferramentas de gestão da qualidade têm sido inventadas e usadas na esperança de suprir a quesitos de idoneidade em respeito ao consumidor, para apresentar um produto seguro e, ao mesmo tempo, considerar as normas de negociação, sobretudo as de exportação, nas quais as exigências são bem mais severos. Além destes quesitos, há também o abatimento dos custos, causada pela diminuição das perdas e aprimoramento da produção, entre outras vantagens (FURTINI et.al 2006).

Mesmo com a importância indiscutível das indústrias que compõe o setor agroalimentar para o país, o número de estudos que relatam a gestão da qualidade em tal setor é pouco significativo. Os produtos agroalimentares são, totalmente, consumidos pelas pessoas, de tal forma que a saúde dos mesmos pode estar gravemente prejudicada em detrimento da qualidade do produto. A legislação tende, com tudo, a desempenhar um controle severo sobre a qualidade final desse tipo de produto, por meio de regras de produção, distribuição e comercialização. Portanto, para determinados setores, a

qualidade é uma vantagem competitiva importante, e para as indústrias agroalimentares, ela é uma questão de sobrevivência. Um problema de má qualidade, no caso extremo de um produto impróprio para o consumo humano, pode comprometer de maneira importante a imagem de uma marca consolidada no mercado (TOLEDO et.al. 2000).

A qualidade hoje é um benefício competitivo, que sobrepõe uma empresa de outra, pois os clientes estão cada vez mais exigentes em relação à sua esperança no momento de comprar um determinado produto. Assim, as indústrias que não se preocuparem com esta procura pela qualidade poderão ficar à margem do mercado consumidor (FIGUEIREDO et.al. 2001).

As ferramentas utilizadas na gestão da qualidade como 5S, e de garantia da qualidade (BPF, PPHO), ainda são rotuladas de modo generalizado, são obrigatórias como pré-requisitos para o sistema APPCC e, a série ISO 9000, é uma ferramenta de controle de processos e gestão da qualidade, por isso, precisa do sistema APPCC como complementação para a segurança sanitária (FURTINI et. al. 2006).

Quando se trata de qualidade para a indústria de alimentos, o enfoque para a segurança do produto é continuamente um fator decisivo, pois algum problema pode afetar a saúde do consumidor. É de se entender, pois, que as boas empresas que atuam no setor alimentar tenham algum sistema e ferramenta eficaz para exercer esse controle (FIGUEIREDO et. al. 2001).

2.2 CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DURANTE O ABATE

O contágio pode vir a ocorrer em etapas do processamento de alimentos, começando na conferência da matéria prima, transformação, conservação e consumo final dos alimentos. O consumo desses micro-organismos patogênicos ou das toxinas produzidas pelos mesmos e que estão nos alimentos é o motivo principal de várias doenças gastrointestinais (ANDRADE et.al. 2010).

Durante o processo de abate, a esola e a evisceração são considerados pontos críticos de controle que poderão determinar uma maior ou menor contaminação das carcaças. A esola é a etapa que mais contribui para a contaminação da carcaça, pois a microbiota do couro é constituída por micro-organismos provenientes do solo e matéria fecal. Desta maneira, é de extrema importância a higienização do animal antes de sua entrada na sala de abate. Por outro lado, a carcaça inevitavelmente entra em contato com o couro, patas, pelos, utensílios (facas), equipamentos, manipuladores(uniformes), água de lavagem e com o ar do abatedouro. Os equipamentos devem ser sanitizados eficientemente e os uniformes dos manipuladores bem higienizados assim como a saúde dos mesmos deve ser controlada. Portanto, quanto maior for o número de animais abatidos por dia, maior serão os riscos de contaminação cruzada (ANDRADE 2005).

Roça (2004), afirma que a probabilidade de contaminação da carne durante o processo de abate é alta, sua intensidade depende da eficiência das medidas higiênicas adotadas. O autor citado deixa também evidente a necessidade prevenir a contaminação cruzada através da realização adequada das operações unitárias praticando procedimentos corretos e padronizados, adotando boas práticas de higiene e monitorando minuciosamente todas as etapas da cadeia produtiva.

Segundo Forsythe (2005), testes microbiológicos do produto final, por si só, não garantem a produção de alimentos seguros. O autor salienta a importância da realização desses testes como suporte a programas de qualidade. Nesse sentido Jay (2005) reforça a utilização de programas de controle de qualidade que pautados por micro-organismos indicadores de patógenos e bactérias deteriorantes

Um programa de higiene (limpeza e desinfecção) deve ser implementado na sala de abate, incluindo os utensílios, equipamentos, manipuladores e o ambiente, assim como na sala de estocagem, desde a recepção do animal vivo até a obtenção do produto final. Portanto, para adquirir uma matéria prima cárnea com qualidade microbiológica, todos os procedimentos antes e durante o abate, devem ser rigorosamente higiênicos e

o pessoal envolvido tanto na limpeza como na manipulação das carcaças e nos seus respectivos cortes, devem ser bem treinados, conhecendo nos mínimos detalhes suas funções e as possíveis consequências da falha das mesmas (MATARAGAS et.al. 2007).

2.3 CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA NO PROCESSAMENTO DE CARNES E DERIVADOS

As etapas pelas quais o alimento deve passar para chegar à mesa do consumidor são longas e numerosas, e até que se origine a linguiça, a carne e demais ingredientes percorrem uma longa cadeia, que apresenta riscos potenciais à segurança do produto. O animal é abatido e transportado à indústria em caminhão frigorífico, onde passa por diferentes processamentos até ser embalado. O produto final é estocado até o momento de envio para o comércio varejista, através de nova etapa de transporte seguido de armazenamento, e finalmente, aquisição pelo consumidor, que também transportará o produto e o estocará, para posterior preparo e consumo (GERMANO, 2003).

Numerosos fatores influenciam o tipo de micro-organismo que contamina a carne e os produtos cárneos frescos, incluindo a faixa de pH; a adição de sal, nitrito, açúcar, fumaça (líquida ou natural), acidulantes e o estado da carne (aquecida, fermentada, ou seca). Após o processamento, o tipo e a proporção da contaminação são influenciados pela embalagem, temperatura de armazenamento, composição final do produto e sobrevivência ou multiplicação de micro-organismos (ANDRADE, 2005).

O potencial para contaminação da carne com perigos químicos e microbiológicos inicia nas áreas de criação, portanto um programa adequado de segurança deve propor estratégias envolvendo o animal ainda vivo, suas condições de saúde e bem estar durante abate, a redução de disseminação de contaminação durante processamento, a temperatura, condições de

armazenamento e distribuição, até chegar ao consumidor final (MATARAGAS et. al., 2007).

Normalmente, considerando as condições ambientais e disponibilidade de certos nutrientes, as bactérias deteriorantes constituem o maior grupo de micro-organismos presentes nas carnes e seus produtos, as quais levam a perda de cor, odor desagradável, formação de muco e de dióxido de carbono (MATARAGAS et al., 2007).

O tipo de microbiota presente nas unidades produtoras é associado à diversidade na formulação dos produtos embutidos, e pode estar relacionada à matéria prima utilizada ou ao ambiente de processamento. É composta por micro-organismos utilizados para fermentação e deteriorantes, que podem causar mudanças negativas na aparência, odor, sabor e consistência do produto final devido a sua atividade metabólica e pode incluir alguns micro-organismos patogênicos (TALON et. al., 2007).

Pesquisa realizada pelo mesmo autor, em 54 unidades processadoras de embutidos em pequena escala do leste e sul europeu demonstrou que todas apresentavam contaminação ambiental por micro-organismos deteriorantes mesmo após processo de limpeza e desinfecção, e que foram encontrados *Salmonella sp.*(4,8%), *Listeria monocytogenes* (6,7%) e *Staphylococcus aureus* (6,1%), sendo os pontos críticos os equipamentos utilizados para corte e embutimento, paredes das câmaras frias, mesas e facas.

Na etapa da trituração dos ingredientes, o aumento da área superficial promove a distribuição da contaminação microbiológica inicial, antes mais restrita à superfície da matéria prima, potencializando a deterioração do produto final com maior rapidez (GONÇALVES, 2003; MILANI et. al., 2003). Durante a moagem e mistura dos ingredientes pode ocorrer contaminação proveniente do contato da carne com os equipamentos, utensílios e pessoal, ou da adição da matéria-prima ou aditivos contaminados (ORDONEZ et al., 2005).

Os condimentos adicionados também podem ser contaminados na origem, estocagem, transporte ou durante manipulação, por esporos, fungos,

leveduras, enterobactérias e bactérias patogênicas como *L. monocytogenes*. (PINTO, 2005).

Os envoltórios naturais utilizados para proteger os embutidos frescos das influências externas, dar forma e estabilidade são provenientes dos intestinos de animais, principalmente suínos. Tendo em vista o elevado grau de contaminação inicial por micro-organismos patogênicos devem ser aplicados cuidados higiênico-sanitários intensos no momento do seu beneficiamento e utilização (PARDI et. al., 1996). JAY (2005) afirma que dentre os ingredientes da linguiça fresca suína, os envoltórios têm demonstrado conter um maior número de bactérias.

Devem ser seguidos também procedimentos de higiene relacionados à manipulação da massa durante o embutimento, evitando contaminação cruzada (PARDI et. al., 1996).

2.4 *Listeria sp.*

As *Listerias* estão vastamente propagadas no meio ambiente e podem ser restauradas da vegetação, solo, alimentos, fezes humanas e de animais, efluente de esgoto e corpos de água (VÁZQUEZ-SALINAS et. al., 2001; QUINN et. al., 2005).

A *L. monocytogenes* tem a propensão de se reproduzir dentro de uma multiplicidade de temperaturas, que vai de 25 a 45°C. No entanto, existem relatos de multiplicação a 0°C. Tem habilidade de tolerar repetidos congelamentos e descongelamentos sem acontecer nenhuma alteração, apesar do pH ótimo para a reprodução desta bactéria esteja entre 6 e 8, ela tolera condições entre 5,5 e 9,6. Na indústria da carne, embutidos e até mesmo os laticínios, este micro-organismo pode ser considerado um problema, já que ela sobrevive aos níveis de nitrato de sódio e de cloreto de sódio recomendados pela legislação vigente (120mg/kg de NaNO₃ e 3% de NaCl) (VARNAM, 1991; QUINN et. al., 2005; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Diversamente diferente da maior parte dos outros micro-organismos patógenos, dispõe de características distintas, podendo desenvolver-se e multiplicar-se em mantimentos mantidos sob refrigeração . Ainda, a resistência do micro-organismo à agentes antimicrobianos (DYKES 2003), os agentes químicos como alguns ácidos e álcalis tem a habilidade de formação de biofilmes sobre algumas superfícies, o que deixa complicada sua eliminação (TAKHISTOV et. al., 2004).

A resistência de *Listeria sp.* à aerossóis resulta na ocorrência da bactéria em ambientes de processamentos de alimentos ou em células aderindo às superfícies de contato. Desta forma, proliferando-se em micro colônias formando biofilme, o que enfatiza inadequada limpeza e higienização (SASAHARA, 1993).

Nas plantas de elaboração de alimentos, as superfícies úmidas abrigam Listerias e isso, unido à capacidade de multiplicação a temperaturas baixas, possibilita encontrá-las em frigoríficos e unidades de refrigeração (ICMSF, 1998). Pisos e ralos são classificados como origem primária de *L. monocytogenes* nos locais de processamento, entretanto consegue-se encontrá-la em diversos aparelhos e locais como vedações, correias transportadoras, máquinas de fatiar, cortar e embalar, contentores, facas, mesas e paredes; muitos pela dificuldade na higienização dessas partes ou equipamentos (VARNAM, 1991; MORETRO et.al., 2004).

Samelis et.al. (1999) isolaram *Listeria sp.* em 14,3% dos equipamentos amostrados, sendo que em 68,8% deles foi observada a presença de *L. monocytogenes*. Em 6,5% das amostras de superfícies de ambiente e equipamentos, pesquisadas na Itália por Peccio et al. (2003), havia *L. monocytogenes*.

A *L. monocytogenes* entra nas plantas industriais por meio da terra existente nos sapatos e roupas dos trabalhadores, da equipe de transporte de alimentos crus de origem animal e possivelmente por meio dos portadores humanos são. As fezes e couro dos bovinos também têm sido identificados como fontes de *Listeria sp.*, incluindo *L. monocytogenes*. Uma vez instalada no local, é capaz de aderir a vários tipos de superfície (que incluem o aço

inoxidável, vidro e borracha). Sobrevive nos dedos dos operários após a lavagem das mãos e nos aerossóis (MARZOCCA et al., 2004; PRENDERGAST et. al., 2007).

Um aspecto notável que deve ser levado em consideração na produção de alimentos é a ocorrência de linhagens de *L. monocytogenes* resistentes, onde as mesmas tem capacidade de conservar-se meses ou até anos, no ambiente produtivo, provocando contágios no produto final (MARKKULA et. al., 2005). O problema em extinguir essa bactéria dos ambientes de produção alimentícia é aumentada pelas situações no ambiente produtivo, como o de umidade, temperatura e existência de material orgânico, que ligadas à capacidade do patógeno em gerar biofilmes, podendo ocasionar a contaminação de maquinários e instrumentos de trabalho (UHITIL et. al., 2004). Entretanto, tais biofilmes tem a capacidade de atuarem como um depósito de *L. monocytogenes* nas indústrias (MORETRO et. al., 2004).

A *L. monocytogenes* é uma bactéria que contamina comum de alimentos, sendo esta sua principal via de transmissão. Estudos realizados no período de 1997 até o ano de 2009, relatam o isolamento dessa bactéria em carne e produtos cárneos, leite cru e supostamente pasteurizado, queijos (particularmente as variedades de maturação suave), sorvete, água, patês de carne, molhos de carne crua e fermentada, salsicha, sanduíches, alimentos prontos para o consumo, arroz frito, saladas, verduras e hortaliças e alimentos de origem marinha, inclusive alimentos refrigerados e, ainda, nos manipuladores destes alimentos. Os manipuladores que atuam na função do abate em si também têm sido reportados como portadores assintomáticos (GARCÍA e CHAVES 2007).

A legislação brasileira não prevê limites de tolerância para a presença do micro-organismo em carnes e produtos cárneos (BRASIL, 2001). Apesar do grande volume de trabalhos realizados sobre *L. monocytogenes*, não há estudos que estabeleçam a real ocorrência do micro-organismo na produção de carne suína brasileira e que forneçam dados para efetivar medidas de controle específicas na obtenção e processamento da carne. (BARROS, 2004)

2.5 LISTERIOSE EM HUMANOS

A Listeriose é uma doença de origem alimentar grave, com altos índices de mortalidade (20% a 30%) em comparação a outras doenças transmitidas por micro-organismos patogênicos transmitidos por alimentos. A doença, em grande parte, afeta segmentos específicos da população que têm maior susceptibilidade, sendo observada principalmente em países industrializados (WHO/FAO, 2004).

A bactéria de gênero *L. monocytogenes* pode causar listeriose invasiva e não-invasiva em humanos. A listeriose invasiva está geralmente associada a grupos de risco, tais como, grávidas e recém-nascidos, indivíduos de idade avançada e em pacientes com sistema imunitário enfraquecido, tais como, entre outros, doentes oncológicos, diabéticos, transplantados, com hepatite ou com HIV. A investigação de surtos recentes tem demonstrado que a infecção por *L. monocytogenes* também provoca gastroenterite febril, especialmente quando são ingeridas grandes quantidades do micro-organismo. A listeriose não-invasiva pode também afetar pessoas saudáveis (CRUM, 2002).

Nas últimas décadas têm sido reportados vários surtos de listeriose com consequências graves para a saúde pública. Por exemplo, um dos mais recentes, foi o surto ocorrido no Canadá em 2008, com 53 casos confirmados, 6 suspeitos e 20 mortes, devido ao consumo de carne processada, proveniente de uma das maiores empresas transformadoras de carne em embutidos no Canadá (WARRINER e NANVAR , 2009).

O período de incubação é variável. Casos de surtos apresentaram um período de 3 a 70 dias após uma simples exposição ao produto implicado, mas a média é estimada em 3 semanas. (FERRONATO, 2010).

2.6 MÉTODOS PARA O DIAGNÓSTICO DE PATÓGENOS

A aplicação da microbiologia de alimentos nas indústrias fundamenta-se na importância dos efeitos que os micro-organismos produzem quando presentes nos alimentos. Em consequência de sua atividade metabólica natural, eles causam alterações químicas na cor, textura, no odor e no aspecto do alimento, a chamada deterioração microbiana. Sua presença também pode oferecer risco à saúde, se for patogênico. E sua presença pode até ser útil, no caso de micro-organismos que causam alterações benéficas. Os métodos convencionais são chamados assim, pois foram desenvolvidos há muitos anos e desde então são utilizados como métodos oficiais na maioria dos laboratórios brasileiros e também em outros países. (FRANCO E LANDGRAF, 2008).

Usualmente, nos laboratórios das indústrias e nas atividades de rotina em laboratórios que prestam serviços de avaliação microbiológica em alimentos, são utilizados os métodos convencionais para a detecção e identificação de micro-organismos que tem como base a microbiologia clássica que se fundamenta, por exemplo, para detecção de uma determinada bactéria em pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento do micro-organismo alvo em meio de cultura apropriado e na confirmação por meio de testes sorológicos, bioquímicos e morfológicos (GANDRA et. al., 2008; LI et. al. 2009; BENETTI, 2009; FDA, 2013). Neste método, usam meios enriquecidos para crescimento, análise e confirmação e estes apresentam, muitas vezes, alto custo para as indústrias. Por isso a necessidade das indústrias de utilizarem métodos alternativos, mais simples, mais rápidos, menos laboriosos e com custo mais baixo. (BERRADA et. al., 2006).

O tempo gasto para a obtenção dos resultados é uma desvantagem muito discutida, pois determinadas análises demandam de vários dias para a obtenção de resultados conclusivos. Apesar dos progressos na formulação de meios de cultura seletivos a detecção continua demorada e trabalhosa (FERRONATO, 2010).

2.7 ANÁLISES MOLECULARES

Vários métodos envolvendo genes estão sendo utilizados com êxito na tipagem molecular de *L. monocytogenes* (PARISI et. al., 2009; DESTRO et. al., 2000).

Chen et. al. (2006) constataram que o ingresso de técnicas moleculares de subtipagem modificou muito o âmbito das análises microbiológicas e proporcionou o entendimento da estrutura da população de *L. monocytogenes* e o progresso de contágio deste micro-organismo. De acordo com Corcoran et. al. (2006) este ingresso tende a ser benéfico na averiguação de ocorrências de surtos de listeriose.

2.7.1 PCR

A PCR é uma técnica de biologia molecular, criada em 1980 por Kary Millis, constituída por um procedimento cíclico *in vitro* com três passos: desnaturação do alvo, hibridização dos iniciadores e polimerização da sequência alvo (ALVES, 2010).

Esse método tem sido aplicado em uma ampla variedade de matrizes alimentícias. No entanto, a ampla aplicação no monitoramento em tempo real ainda é pouco observada, embora representem uma vantagem competitiva (RODRIGUES, 2013).

A PCR é baseada num ciclo repetitivo de três reações que ocorrem em diferentes temperaturas de incubação, em um mesmo tubo e na presença de reagentes termo-estáveis. Em adição à sequência específica de DNA a ser amplificada, os reagentes são dois pequenos oligonucleotídeos iniciadores, denominados *primers*, sintetizados para serem complementares às sequências conhecidas do DNA-alvo, grande quantidade dos quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatados e a enzima termo-estável Taq DNA polimerase, isolada de bactéria termofílica (GANDRA et. al. 2006).

Von (2006) realizou trabalho parecido, no qual confrontou a técnica convencional com a imunoenálise e o método de análise por PCR em cinco etapas do processamento de abate de frangos, com o intuito de recomendar um método alternativo para o monitoramento no programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Concluiu-se que a PCR e foram mais sensíveis, rápidas e práticas do que a metodologia tradicional, e a PCR, ofereceu despesas similares ao método de técnica convencional, opostamente ao método imunoenalítico.

Dentre as vantagens de se utilizar a PCR como alternativa à microbiologia convencional, estão a simplicidade da técnica, menor custo da análise, maior sensibilidade, especificidade e rapidez (MALDONADO, 2008).

Na última década, o PCR tornou-se a técnica genética mais utilizada em diagnóstico microbiológico. Mesmo com o aumento da utilização das técnicas moleculares, em estudos de microbiologia de alimentos, escassas são as publicações em português que relacionem estas técnicas com esta área (GANDRA et.al. 2008).

De acordo com Rodríguez-Lázaro et al. (2007), PCR será utilizado como um procedimento de rotina comum em laboratórios de análise dentro dos próximos dez anos.

3 METODOLOGIA

3.1 CLASSIFICAÇÃO DA PESQUISA

A presente pesquisa é classificada do ponto de vista de sua natureza como aplicada, pois, tem o objetivo de gerar conhecimentos para aplicação prática e dirigida à solução de problemas específicos.

Levando em consideração o problema, trata-se de uma pesquisa quantitativa e qualitativa, pois, como descrito por Gil (1992), a pesquisa traduzirá em números opiniões e informações para classificá-las e analisá-las, mas, também os dados obtidos serão analisados indutivamente.

No que diz respeito aos objetivos, ela pode ser classificada como explicativa. Visa identificar os fatores que determinam ou contribuem para a ocorrência dos fenômenos (GIL, 1992). Esse mesmo autor ainda classifica quanto aos procedimentos técnicos, no caso desse estudo trata-se de uma pesquisa experimental, pois será determinado um objeto de estudo, as variáveis capazes de influenciá-lo serão selecionadas, e as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto serão definidas.

O método científico utilizado será o do tipo Indutivo. De acordo com Lakatos e MARCONI (2005), é um método que parte de dados particulares para obtenção de uma verdade geral não contida nas partes examinadas.

3.2 LOCAL DA PESQUISA E COLETA DAS AMOSTRAS

A pesquisa foi realizada em um frigorífico de suínos e fábrica de embutidos que atua sob o serviço de inspeção do Paraná, para produtos de origem animal SIP/POA. A empresa localizada na região dos Campos Gerais, Paraná, possui capacidade de abate média diária de 400 suínos/dia e produção diária de embutidos correspondente a 1,5 toneladas.

A amostragem ocorreu no início do primeiro turno de abate, e os pontos escolhidos tiveram como base os pontos estudados por Monteiro et. al.

(2014). Houveram amostragens através do sistema de *swabs*. Os pontos analisados assim como as áreas amostradas, foram codificadas através de números de 1 até 21.

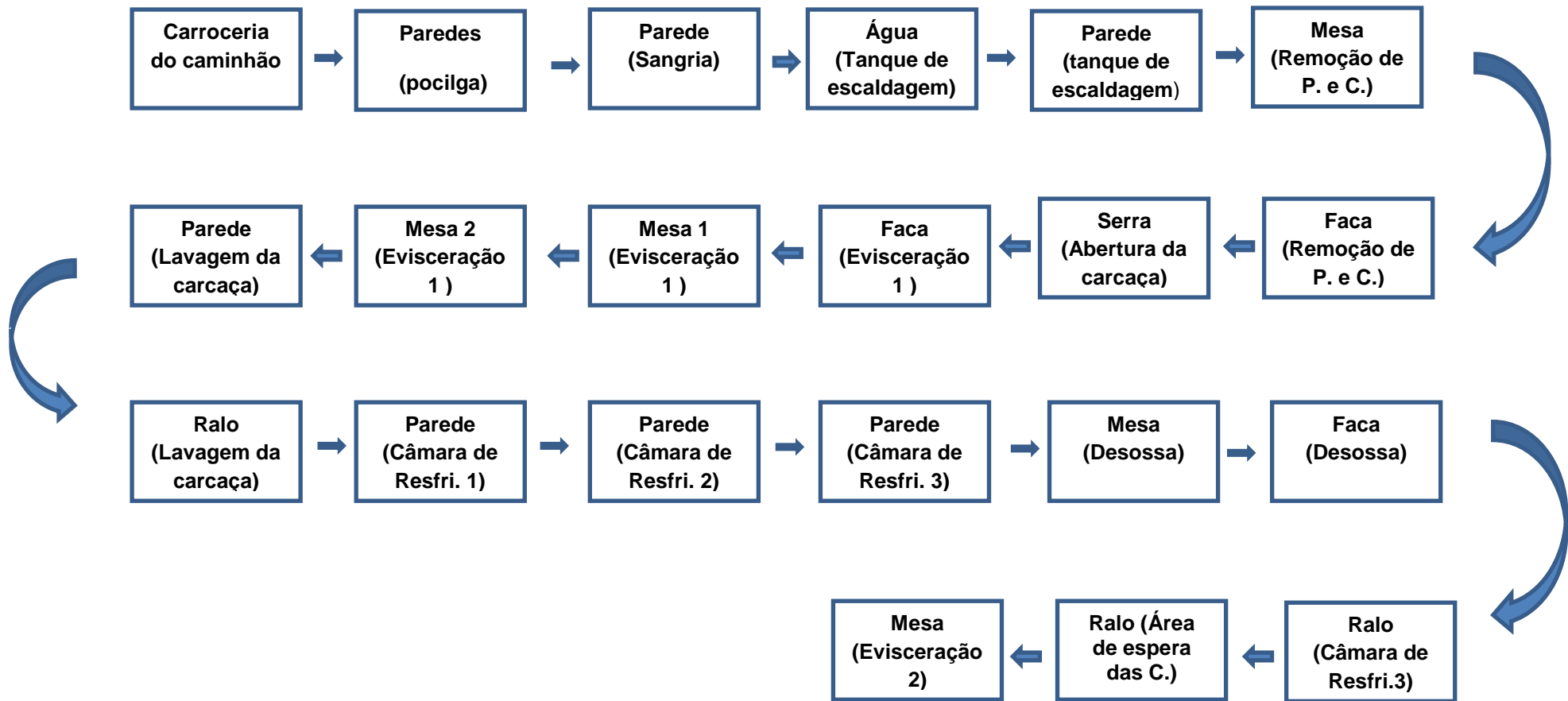


Figura 1 :Fluxograma dos locais amostrados na coleta 1

Legenda: Remoção de P. e C: Remoção de patas e cabeças. Área de espera das C.: área de espera das Câmaras de Resfriamento.

Fonte: Autoria Própria, 2015.

Depois de 3 meses, realizou-se outra coleta, ordenando os pontos de acordo com os resultados obtidos na primeira análise. Partiu-se da ideia de averiguação mais profunda dos pontos positivamente encontrados na primeira coleta. Os novos pontos estão demonstrados na figura 2.

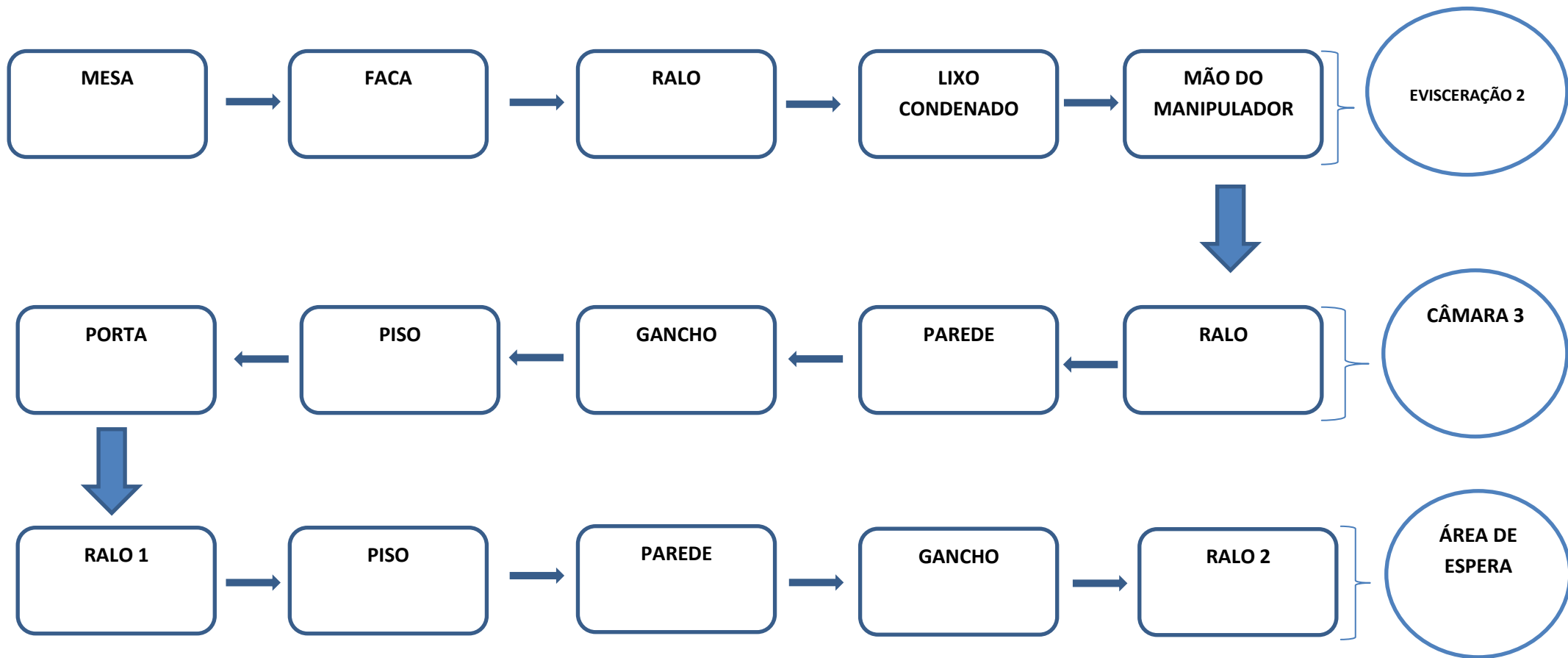


Figura 2: Fluxograma dos pontos amostrados na segunda coleta.
Fonte: Autoria Própria, 2015.

A amostragem ocorreu por meio de *Swabs* (técnica de esfregação de superfície), que consiste na fricção de um cotonete estéril sobre a superfície a ser analisada, no interior de um molde estéril com área de 25 cm², revertendo-se a direção entre as sucessivas passagens (ABNT, 1998; SILVA JUNIOR., 2001). Os *swabs* contendo as amostras foram resuspenso em 9mL de caldo LEB (Caldo de Enriquecimento de *Listeria*) e mantidas sob refrigeração até o seu processamento. Após coletadas, as amostras de *swab* foram encaminhadas sob-refrigeração para o Laboratório de Microbiologia da UTFPR – Campus Ponta Grossa, para incubação, onde permaneceram 24h sob temperatura de 37°C. Depois de incubadas seguiram para o Laboratório de Bioengenharia da UTFPR – Campus Ponta Grossa para realização dos testes de PCR.

A amostra de água foi coletada em frasco estéril, transportada sob refrigeração, para posterior análise de PCR no Laboratório de Bioengenharia do mesmo Campus.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA DE *Listeria monocytogenes*

Para o procedimento da extração de DNA, o método utilizado foi obtido por lise térmica. O protocolo foi proposto por Monteiro (2014).

Para a obtenção do DNA extraído, transferiu-se 2 ml de uma cultura de 24 horas em caldo LEB para um microtubo estéril. Após centrifugação a 5.000 rpm durante 4 minutos, o sobrenadante foi desprezado, o pellet foi lavado três vezes com 500 µl de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,8) e submetido a uma centrifugação por dois minutos a 5.000 rpm. O pellet foi suspenso novamente em 100 µl de TE e mantido no banho seco, com temperatura de 98° por 10 minutos. Em seguida foi feita centrifugação a 12.000 g durante 30 segundos e o sobrenadante foi estocado a -20°C para posterior utilização.

3.4 REAÇÃO DA PCR

Após a realização da extração de DNA, partiu-se para a análise de PCR, seguindo o modelo descrito por Monteiro, 2014.

A reação denominada “mix”, continha 1 µl de cada primer (10 µM), 5 µl de tampão de PCR 10 X, 1,5 µl de MgCl₂ (50mM), 1 µl da mistura de nucleotídeos (10 mM), 0,2 U de Taq polimerase, 3µl de DNA bacteriano e água Milli-Q para completar um volume de 25 µl. As condições de amplificação foram: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos à temperatura de anelamento dos *primers*, que foi 50°C e 45 segundos a 72°C, e uma extensão final de 5 minutos a 72°C, como descrito por AZNAR e ALARCÓN (2003).

Após realizado a PCR, as amostras foram submetidas a Nested PCR, visando a exclusão de resultados falso-positivos. Como controle positivo da reação, utilizou-se DNA extraído da amostra de *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, e como controle negativo, água Milli-Q esterilizada. Os *primers* utilizados na reação estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 Primers utilizados na reação da PCR para *Listeria monocytogenes*

Primers	Gene-alvo	Produto amplificado(pb)	Referência
CCTAAGACGCCAATCGAA	hlyA F	702pb	Border et al. (1990)
AAGCGCTTGCAACTGCTC	hlyA R		

Fonte: Aatoria Própria, 2014

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose, aproximadamente uma hora utilizando-se 70 volts. O gel de agarose foi submerso em solução de brometo de etídio durante 15 minutos e fotografado solução de brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL, por 10 minutos e fotodocumentados em transiluminador ultravioleta utilizando software

LpiX Image para a visualização das bandas. Utilizou-se marcador de peso molecular de 100 pb para estimativa do tamanho dos produtos de PCR.

3.5 SEQUENCIAMENTO

As amostras foram sequenciadas no laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico. Para as etapas do sequenciamento seguiu-se os protocolos propostos por Maciel (2010). Como etapa inerente ao sequenciamento, procedeu-se a purificação dos produtos de PCR. A purificação foi efetuada, empregando-se o kit ExoSap (USB Corporation), Este protocolo funciona de forma enzimática, sendo utilizadas as enzimas EXONuclease I e “Shrimp Alkaline Phosphatase”, que em conjunto dá nome ao kit. A primeira degrada o excesso de DNA fita simples (primers) e a segunda degrada nucleotídeos não incorporados durante a reação de PCR (dNTPs).

O protocolo estabelece um volume de 1µL de ExoSAP diluído (1:4, sendo 1 parte de ExoSAP em 3 de água) a 10µL de produto de PCR, depois foi levado a evar ao termociclador a 37°C por 30 minutos e 80°C por 15 minutos e por fim as amostras purificadas ficaram armazenadas à 4°C até a reação de sequenciamento.

A purificação do DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito no kit Qia-quick (QIAGEN). O DNA foi armazenado a -20°C para ser, futuramente, sequenciado.

O sequenciamento do DNA foi realizado por meio do método de terminação em cadeia por didesoxinucleotídeos (ddNTPs), utilizando-se o sequenciador automatizado “MegaBace DNA Analysis System 500” da AMERSHAM Biociences CORP, sendo empregados os mesmos primers utilizados na amplificação. O sequenciamento foi conduzido nas dependências do laboratório de Genômica, localizado no BIOAGRO.

As sequências obtidas para cada haplótipo foram editadas, utilizando-se o programa computacional Sequencher versão 4.1.4 e alinhadas com a introdução de gaps (quebra da continuidade da sequência de DNA), para compensar inserções e deleções de bases.

As sequências completas de nucleotídeos dos quatro isolados de *L.monocytogenes* , encontradas neste trabalho, foram utilizadas para buscas de sequências similares em bancos de dados, usando-se a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) na página do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, acessado em dez. de 2014). O alinhamento resultante dessas sequências foi usado, posteriormente, para verificar se *L. monocytogenes* se aloca junto dos demais bactérias patogênicas da mesma espécie.

Os programas computacionais utilizados para alinhamento e construção da árvore filogenética foram, respectivamente, o ClustalW (Thompson et al., 1994) e o MEGA versão 4.0 (Tamura et al., 2007). De posse do alinhamento, a árvore filogenética foi construída, utilizando-se o método de distância de neighbor-joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987), com base no modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros, considerando-se, apenas, as regiões do gene que apresentaram máxima identidade para todas as sequências analisadas. Este modelo foi escolhido, após verificar que o número de transversões foi maior do que o esperado, considerando-se a sequência de nucleotídeos em estudo.

O método NJ se baseia na união de duas espécies que, além de estarem próximas umas das outras, também estejam conjuntamente, distantes do restante das espécies. Este método é utilizado a fim de minimizar a soma dos tamanhos de todas as arestas da árvore. Assim, se duas espécies são designadas como vizinhas e são ligadas, uma nova espécie combinada é criada, sendo que as espécies agrupadas são retiradas da matriz. O número de espécies é reduzido de um e o procedimento é novamente aplicado, para encontrar novos vizinhos. O ciclo se repete até que o número de espécies se torne igual a dois.

A robustez dos nódulos da árvore foi testada, por meio da metodologia de bootstrap com 99 réplicas, utilizando o programa MEGA, versão 3 (Tamura et. al.2007). O procedimento bootstrap consiste na reamostragem de mesmo tamanho e com reposição (bootstrapping) do conjunto de dados da amostra original.

3.6 LEVANTAMENTO DOS SISTEMAS DE DIAGNOSTICO DE *Listeria monocytogenes* ENCONTRADOS EM LABORATÓRIOS COMERCIAIS.

Foram pesquisados, via internet, laboratórios de microbiologia no Brasil. Depois de organizar uma lista de laboratórios de análises microbiológicas, lhes foi solicitado, via telefone, a técnica utilizada pra o diagnostico, os valores e tempo total de diagnostico do micro-organismo. Em paralelo foi feito uma investigação, via telefone, nos laboratórios que prestam serviços de diagnóstico molecular, especificamente com análises de PCR. Questionamentos foram feitos sobre valores cobrados pelo serviço e também o tempo estimado para a entrega dos resultados. Dez laboratórios, denominados L1 ,L2 ,L3 , L4, L5, L6, L7, L8, L9 e L10 foram utilizados nesta item da pesquisa.

A fim de se comparar a diferença de valores entre a microbiologia convencional e as análises de PCR, foi realizado uma estimativa dos custos de todos os reagentes envolvidos nas análises. O custo de equipamentos não foi inserido devido aos mesmos serem de patrimônio da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa.

O calculo baseia-se no valor total dos reagentes comprados no ano de 2013. Pegou-se o custo total dos reagentes e dividiu-se pela quantidade de gramas da embalagem, para se ter o valor exato por grama. Após isso, multiplicou-se pela quantidade que foi utilizada na reação. Assim conseguiu-se o valor de custo para cada grama. O mesmo ocorreu com os reagentes líquidos, e no final se obteve o valor de cada uL.

4 RESULTADOS

4.1 EXTRAÇÃO DE DNA DE *Listeria monocytogenes*

Os teste de extração seguiram os protocolos descritos no itens 3.3, para os quais foram testados protocolos com base em sal de CTAB desenvolvido para *Listeria monocytogenes*. Posteriormente realizou-se os teste para lise térmica fazendo com q o processo de 12 horas finalize 2 horas.

Os resultados demonstraram a possibilidade aplicar a lise térmica nas amostras. A lise térmica tem como principal ação a T sobre a amostra a qual desnatura proteína e expõe DNA para análise. Estes resultados foram demonstrados nas amostras e descritos com pertinência em MONTEIRO, 2014 (ANEXO A).

4.2 REAÇÃO DA PCR

Em relação a etapa de ajuste de condições de reação e análise de PCR, as mesmas também estão descritas no artigo citado anteriormente. E foi repetida em todos os procedimentos que a análise se fez necessária.

O primer hylA se mostrou extremamente eficaz para as análises, tornando-se assim o único utilizado neste estudo.

4.3 ANALISE DE *Listeria monocytogenes* NO PROCESSO PRODUTIVO.

Das 21 amostras coletadas no estabelecimento estudado, três tiveram respostas confirmativas para *Listeria monocytogenes*, representando 14% do total, sendo uma da mesa de evisceração e duas isoladas de ralos do ambiente frigorífico. As bandas demonstrando o resultado positivo podem ser observadas na figura 3.

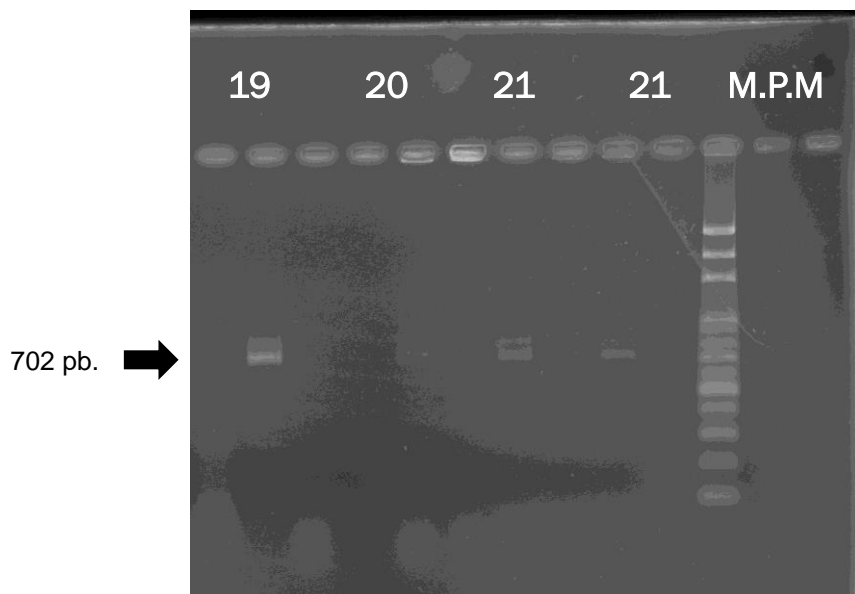


Figura 3: Resultado positivo para *Listeria monocytogenes* nos pontos 19, 20 e 21.

M.P.M: Marcador de peso molecular.

Fonte: Autoria própria, 2015.

Os resultados obtidos foram tabelados, visando uma maior compreensão e visualização do local exato da contaminação.

Tabela 2: Detecção presença de *L. monocytogenes* em ambiente produtivo de Abatedouro-Frigorífico através de técnica de PCR

LOCAL AMOSTRADO	NUMERAÇÃO	PRESENÇA DE <i>L.monocytogenes</i>
Carroceria do caminhão	1	-
Paredes(Pocilga)	2	-
Parede (Sangria)	3	-
Água (Tanque de escaldagem)	4	-
Parede (tanque de escaldagem)	5	-
Mesa (Remoção das patas e cabeças)	6	-
Faca (Remoção das patas e cabeças)	7	-
Serra (Abertura da carcaça)	8	-
Faca (Evisceração 1)	9	-
Mesa 1 (Evisceração 1)	10	-
Mesa 2 (Evisceração 1)	11	-
Parede (Lavagem da carcaça)	12	-
Ralo (Lavagem da carcaça)	13	-
Parede (Câmara de Resfriamento 1)	14	-
Parede (Câmara de Resfriamento 2)	15	-
Parede (Câmara de Resfriamento 3)	16	-
Mesa (Desossa)	17	-
Faca (Desossa)	18	-
Ralo (Câmara de Resfriamento 3)	19	+
Ralo (Área de espera das Câmaras de Resfriamento)	20	+
Mesa (Evisceração 2)	21	+

Fonte: Autoria Própria, 2015

Esses resultados demonstram que existem pontos de contaminação de *Listeria monocytogenes* em lugares estratégicos na planta de processamento de carne suína, o que torna-se um fato preocupante devido a periculosidade do micro-organismo em estudo (ANEXO B).

Já na segunda coleta, realizada na sala de evisceração 2 (triparia, área de espera das câmaras e da câmara 3, os resultados foram em maior quantidade, dos 15 pontos analisados, 9 apresentaram contaminação por *Listeria monocytogenes*, conforme observa-se na figura 4.

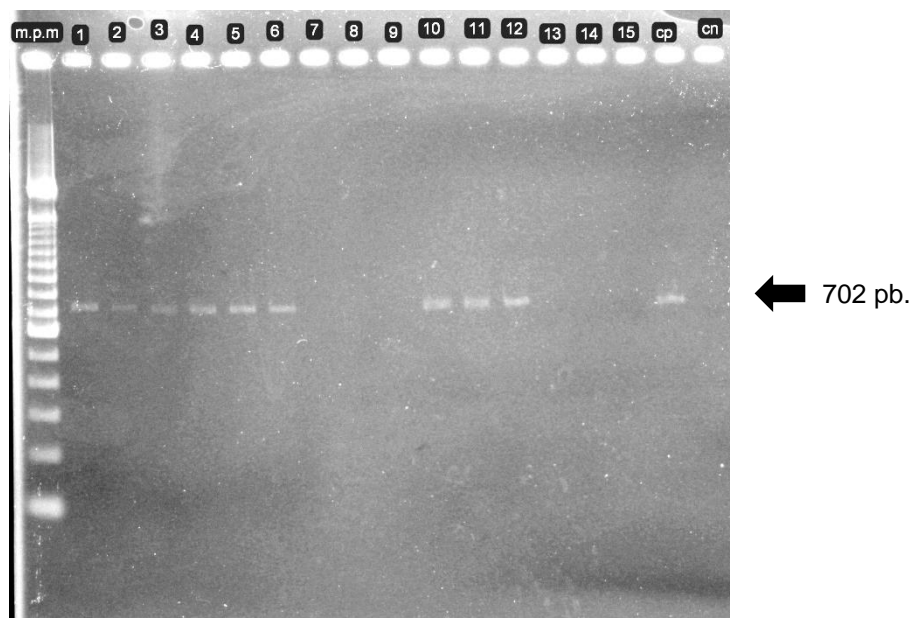


Figura 4: Resultados da análise de PCR nos pontos amostrados na coleta 2

Legenda: M.P.M : marcador de peso molecular. Cp: controle positivo. Cn: Controle negativo

Fonte: Aatoria Própria, 2015.

Esses resultados identificam a presença de *L. monocytogenes* em vários pontos do ambiente industrial deste estabelecimento, e com isso pode ocorrer a contaminação de produtos em processamento, ou até mesmo dos seus funcionários. De qualquer forma, a higienização rigorosa do ambiente de abatedouros-frigoríficos deve fazer parte de medidas de controle para prevenir este micro-organismo, visando evitar os resultados positivos encontrados como os encontrados nesta pesquisa.

Alguns patógenos, como é o caso desta em estudo, podem fixar-se no ambiente da planta de processamento e encontrar nichos onde podem sobreviver por longos períodos de tempo (ZANQUETTA et.al. 2013). Uma das hipóteses para a presença do micro-organismo nesta planta em questão, é a

formação de aerossóis produzidos durante a etapa de limpeza/desinfecção, esta fase pode estar sendo realizada de forma inadequada ou ineficiente.

No estudo feito por Caselani (2013), analisou 411 amostras de plantas processadoras de carne de frango e de carne de suínos, sendo que 62 foram positivas para *L. monocytogenes*. Essa detecção se deu durante o processamento e após a higienização, e concluíram que a presença de resíduos orgânicos, pH neutro, baixas temperaturas e alta umidade favorecem à contaminação por este micro-organismo. Este dado pode explicar os resultados confirmativos desta pesquisa, pois esta é uma condição rotineira nos setores de processamento do abatedouro, devido à presença de resíduos orgânicos, pedaços de gorduras e sangue, bem como a baixa temperatura do ambiente.

Apesar da Circular no 354/2004 do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) não estabelecer limites para as estimativas de *Listeria sp.* e *L. monocytogenes*, de acordo com a legislação, resultados positivos frequentes (mais de dois) em amostras ambientais para *L. monocytogenes*, indicam a necessidade de realização de testes no produto final para avaliar a inocuidade do mesmo (BRASIL, 2004).

Resultados positivos em amostras no processo produtivo para *L. monocytogenes*, indicam a necessidade de realização de testes no produto final para avaliar a inocuidade do mesmo. Mesmo nos casos em que os índices não é extremamente alto, como os encontrados neste trabalho, são importantes para avaliar os programas de qualidade do local de abate e processamento, buscando a ausência de contaminação do produto final.

Von Laer (2004) ao analisar amostras coletadas em uma planta de processamento de linguiça mista frescal, localizada na cidade de Pelotas/RS, Brasil, detectou a presença de *L. monocytogenes* em 21% (4) e 20,8% (5) das 19 amostras de ambientes e 24 de equipamentos, respectivamente. Esse resultado em conjunto com o obtido neste estudo, demonstra que apesar de ser comum a presença de *Listerias* no ambiente produtivo de abate e processamento de carnes, um fator determinante para evitar a disseminação das mesmas nestes locais, seria uma política de higiene mais eficaz e realizada da forma correta (SANTOS et.al 2013)

Este trabalho confirmou resultados registrados na literatura para *Listeria monocytogenes*, em que a presença do micro-organismo nas portas, paredes e ralos mostrou-se positiva. (MENEZES et.al 2014, CESAR et.al 2011). A pesquisa de Silveira (2010) verifica ser o piso e os ralos os importantes focos de contaminação para o produto final, uma vez que todas as amostras de piso e ralos coletadas apresentaram contaminação por *L. monocytogenes*, assemelhando-se aos resultados encontrados neste trabalho. A mesma autora cita em seus estudos que todas as amostras de ralo apresentaram colônias típicas de *Listeria* sp, evidenciando também a questão higiene como uma das principais causas de presença do patógeno no ambiente de processamento, mesmo em se tratando de pisos e ralos.

Suínos carregam a bactéria no trato gastrintestinal, como pode ser observado em estudos que amostraram fezes nas paredes do local de abate e *swabs* peri-anais de animais ao abate. A partir desses animais carreadores, as carcaças seriam contaminadas pelo extravasamento do conteúdo intestinal na linha de processamento (THEVENOT *et al.*, 2006). Esta informação é compatível com o resultado obtido neste estudo, onde foram encontrados de *L. monocytogenes* após a evisceração, no caso na amostra 21 da primeira coleta e 1B da segunda, que são os locais onde as vísceras são preparadas para higienização. Outros estudos demonstram que o local de retirada e estocagem de vísceras albergam populações ainda mais elevadas de *L. monocytogenes* que sendo uma importante origem de contaminação (AUTIO *et. al.*, 2000; THEVENOT *et. al.*, 2006), o que também pode ser confirmado com as amostras citadas anteriormente..

Comparando os resultados obtidos com os encontrados por Santos *et. al.* (2011) que demonstrou *Listeria* sp e *L. monocytogenes* nos pontos de evisceração e ralos da refrigeração, prova-se que este micro-organismo é resistente técnicas de higiene usadas em frigorífico. A autora ainda disserta que a carcaça pode ser contaminada por fezes de animais portadores sadios ou doentes, durante o abate ou de contaminação oriunda do próprio ambiente de abate.

A presença de *L. monocytogenes* em portas também é bastante comum, como já citado anteriormente, porém este fato não deveria existir já que a

empresa estudada conta com serviços de higienização no início e final do abate, o que evidencia mais uma vez que a higiene não está sendo efetiva e conclusiva para a não contaminação do ambiente, ou seja, os funcionários não estão executando as medidas de higiene da forma correta ou os produtos que são aplicados no ambiente produtivo não está sendo eficaz na eliminação de resíduos dos animais que podem disseminar a contaminação e proliferação de micro-organismos patogênicos.

A mão do manipulador do setor de evisceração, denominada amostra 4B, também apresentou amostra confirmativa, demonstrando também o que já foi citado anteriormente. O funcionário trabalha com contato direto com as fezes dos animais, dificultando a ausência de micro-organismos patogênicos no local. Mesmo assim, a higienização deste local deveria ser feita da melhor maneira possível, já que as tripas serão encaminhadas para o processamento de linguiça, podendo levar a contaminação do produto final. Segundo a legislação vigente, os manipuladores também podem ser agentes causadores de contaminação por não adotarem práticas de higiene pessoal (BRASIL, 2004).

A coleta da faca, mesmo após a limpeza demonstrou q a higienização não foi efetiva para a presença deste micro-organismo, deixando ainda mais preocupante o resultado deste estudo. Fato que também foi observado por Eustace et. al. (2007), onde analisaram facas usadas por operadores no processo de abate, imediatamente após a limpeza, e obtiveram respostas confirmativas. Uma das explicações para tal fato se da à sobrevivência de *L. monocytogenes* em superfícies através da formação de biofilme, dificultando sua eliminação somente com água.

Outro local que apresentou *Listeria* foi à área de descarte do estabelecimento, codificada como amostra 5B. Neste local estão todos os lixos condenados, como pelos e dejetos dos animais. Neste tipo de ambiente é comum a presença de vários patógenos devido à presença das fezes, como cita Caselani (2010), quando diz que peles e pêlos impregnados de sujidades e fezes podem carrear milhões de bactérias aeróbias e anaeróbias para o interior dos ambientes de abate e processamento.

Dos programas utilizados cotidianamente por indústrias alimentícias, os executados neste estabelecimento, são as Boas Práticas de Fabricação e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP) (PETTINATI, 2006). Estes, podem ter influenciado nos resultados dos demais ambientes que apresentaram resultados negativos para *L. monocytogenes*, mas ainda assim não estão sendo executados da maneira correta, devido a apresentação de resultados positivos.

O Estabelecimento já conta com medidas corretivas, visando a qualidade no processamento e produto final. Foram realizados treinamentos com os funcionários com o intuito de promover a conscientização dos manipuladores com relação à veiculação da contaminação oriunda de práticas inadequadas de higiene, porém novos treinamentos devem ser executados para a fixação da importância da higiene no processo produtivo.

A implantação das BPF é o início para o progresso da segurança alimentar e para sucesso dessa implantação é extremamente importante que os manipuladores e demais funcionários estejam comprometidos com a rotina. Lopes, (2008) diz que o trabalhador instruído efetivamente conseguirá perceber as falhas no processo produtivo e também pode assessorar como agente disseminador. Dessa forma, a higiene pessoal é uma exigência seja qual for a atividade de controle da qualidade.

As BPF são pré-requisitos indispensáveis para a implantação de qualquer programa de qualidade, e consistem em um conjunto de princípios e regras para a correta manipulação de alimentos, considerando desde a matéria-prima até o produto final. Envolve ainda as condições de armazenamento, condições estruturais de edifícios, condições de equipamentos, sanificação de equipamentos e estabelecimentos, controle de pragas, higiene pessoal e tratamento de efluentes. As portarias 326/97 do Ministério da Saúde e a portaria 368/97 do Ministério da Agricultura determinam a obrigatoriedade da utilização das Boas Práticas de Fabricação nos estabelecimentos produtores e indústrias de alimentos (PASCHÉ et. al. 2013).

A pesquisa de *L. monocytogenes* em estabelecimentos de abate de suínos brasileiros merece maior atenção das autoridades de Saúde Pública e

das instituições de ensino e pesquisa visando o bem estar da população e a qualidade microbiológica dos alimentos produzidos neste país.

Considerando a incipiente investigação nacional de *L.monocytogenes* no processo de abate de suínos, os resultados desta pesquisa alertam para a demanda de novas investigações dessa natureza, incluindo a avaliação de riscos, para estabelecer uma condição sanitária mais clara com relação aos possíveis riscos de transmissão da listeriose ao ser humano a partir do processo de abate de suínos, dada a grande diversidade de padrões higiênico-sanitários de abate existente no Brasil.

Von Laer (2006), ao analisar, através da PCR, amostras coletadas em uma planta de processamento de linguiça mista frescal, localizada na cidade de Pelotas/RS, Brasil, detectou a presença de *L. monocytogenes* em 21% (4) e 20,8% (5) das 19 amostras de ambientes e 24 de equipamentos, respectivamente. Demonstrando mais uma vez, a importância das análises rápidas no ambiente produtivo, afim de se prevenir a contaminação de *L. monocytogenes* no processamento de produtos cárneos.

De acordo com Rodrigues et al. (2011), é possível observar que o diagnóstico molecular via amplificação de DNA (PCR) está em crescimento e conseqüentemente as inovações relacionadas serão notáveis nos próximos anos, com a valorização do limiar de detecção e tempo de análise, o que é considerado uma inovação tecnológica.

Vale reforçar que a indústria deve estar atenta a esta tendência, pois pode estar elevando a credibilidade e a vantagem competitiva da empresa, pois fatores como alta confiabilidade, sensibilidade, especificidade, tempo de análise, custos, entre outros, são aspectos relevantes associados à PCR.

Por mais que *L. monocytogenes* tenha sido encontrado em locais cotidianos para sua proliferação e que a incidência tenha sido baixa no estabelecimento estudado, observa-se uma evidente preocupação com o controle de qualidade e melhoria no processo de higiene do estabelecimento, pois o mesmo agora conta com serviços de auditoria e monitoramento das condições microbiológicas em todo o processo industrial, mantidos sob inspeção do SIP/POA.

4.4 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS A PARTIR DE FOCOS DE CONTAMINAÇÃO

Das 10 amostras submetidas ao sequenciamento, somente 4 apresentaram sequencias possíveis de serem analisadas, são elas as amostras 1(mesa da evisceração(triparia), 5(lixo condensado do frigorifico), 9(ralo da câmara de resfriamento 3) e 10(área de espera das câmaras).

Na figura 5, são apresentadas os alinhamentos das sequencias, onde foi possível observar as regiões onde os nucleotídeos se repetiam e desta forma foi gerada uma sequencia padrão.

Species/Abbrev	Group Name	Sequence
1. Listeria monocytogenes isolate 1		ACAAGGATTGGATTACAATAAAAAACAATGTATTAGTATACCCAGGAGATGCAGTGACAAATGCGCCGCAAGAAAAGTTATAAAGATGGAAATGAATATATC
2. Listeria monocytogenes isolate 5		ACAAGGATTGGATTACAATAAAAAACAATGTATTAGTATACCCAGGAGATGCAGTGACAAATGCGCCGCAAGAAAAGTTATAAAGATGGAAATGAATATATC
3. Listeria monocytogenes isolate 9		ACAAGGATTGGATTACAATAAAAAACAATGTATTAGTATACCCAGGAGATGCAGTGACAAATGCGCCGCAAGAAAAGTTATAAAGATGGAAATGAATATATC
4. Listeria monocytogenes isolate 10		ACAAGGATTGGATTACAATAAAAAACAATGTATTAGTATACCCAGGAGATGCAGTGACAAATGCGCCGCAAGAAAAGTTATAAAGATGGAAATGAATATATC
5. X60035.11 L.monocytogenes		ACAAGGATTGGATTACAATAAAAAACAATGTATTAGTATACCCAGGAGATGCAGTGACAAATGCGCCGCAAGAAAAGTTATAAAGATGGAAATGAATATATC
6. LISHLVA L.monocytogenes		ACAAGGATTGGATTACAATAAAAAACAATGTATTAGTATACCCAGGAGATGCAGTGACAAATGCGCCGCAAGAAAAGTTATAAAGATGGAAATGAATATATC
7. Listeria monocytogenes strain ATCC 19116		ACAAGGATTGGATTACAATAAAAAACAATGTATTAGTATACCCAGGAGATGCAGTGACAAATGCGCCGCAAGAAAAGTTATAAAGATGGAAATGAATATATC
8. Listeria monocytogenes ATCC 9525		ACAAGGATTGGATTACAATAAAAAACAATGTATTAGTATACCCAGGAGATGCAGTGACAAATGCGCCGCAAGAAAAGTTATAAAGATGGAAATGAATATATC
9. Listeria seeligeri isolate FSL S4-212		TTGGGGATTAAACTATGATAAAAAATAGTATTCTGGCTATCAAGGTGAAGCAGTTACAAACGTTCCACCGAAAAAGGGCTACAAGATGGCAATGAATATATC
10. Listeria seeligeri isolate FSL S4-200		TTGGGGATTAAACTATGATAAAAAATAGTATTCTGGCTATCAAGGTGAAGCAGTTACAAACGTTCCACCGAAAAAGGGCTACAAGATGGCAATGAATATATC

Figura 5: Alinhamento das sequencias de DNA.

Fonte: Autoria Própria, 2015

Na figura 6, apresenta-se a árvore filogenética das *Listerias* sequenciadas, e a porcentagem de similaridade entre os micro-organismos isolados. Observa-se que todas as amostras sequenciadas possuem 100% de similaridade entre elas, ou seja, todas são da mesma família gênica e 99% de similaridade coma linhagem *Listeria monocytogenes* ATCC19116, causador da listeriose , doença causadora de óbitos no mundo.

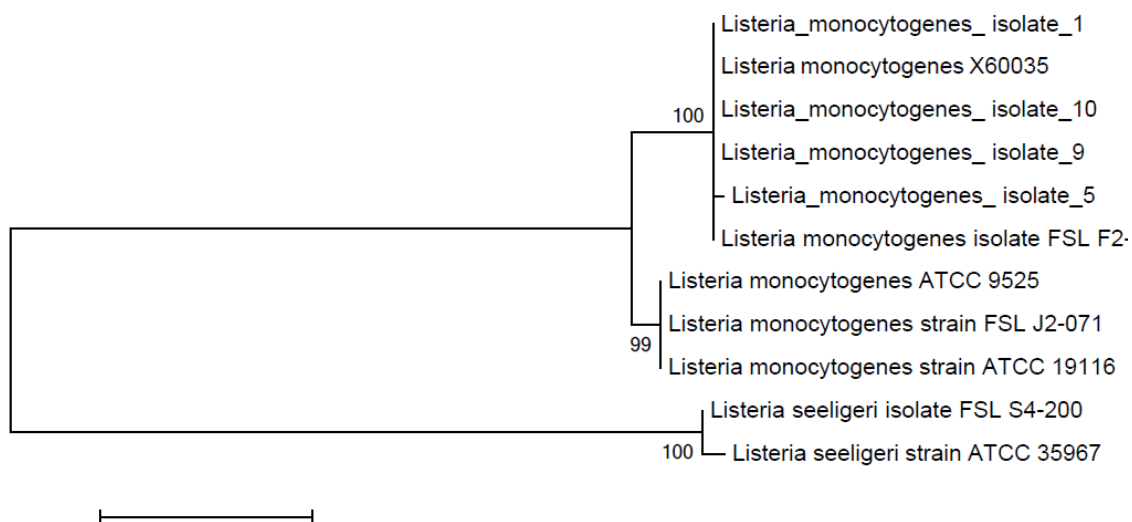


Figura 5: Árvore filogenética proveniente do sequenciamento.

Fonte: Autoria Própria, 2015

A explicação para tal, se deve ao fato de existir uma disseminação da bactéria em toda a planta do estabelecimento, já que a sala de evisceração 2 (triparia), que é o ponto inicial da presença de *Listeria monocytogenes*, e onde possivelmente iniciou-se a disseminação da bactéria para os demais ambientes, encontra-se a mais de 20 metros das salas de refrigeração onde a mesma também foi encontrada. O local onde também obteve-se essa confirmação, o lixo contaminado (amostra 5), encontra-se no lado de fora do abatedouro, e por ser um ambiente com muitos dejetos considera-se comum a presença de *L. monocytogenes*.

O resultado encontrado pode ser considerado um grave problema de falta de higienização correta no estabelecimento. Apesar de ser inevitável a entrada das fezes dos animais, local onde se encontram *L. monocytogenes*, a presença das linhagens que também estão na sala da triparia, demonstra que os programas de qualidade não estão sendo executados de maneira eficaz, ou como já comentado, pode estar acontecendo uma possível contaminação cruzada dentro da planta processadora.

Lotfollahi (et. al. 2014) utilizou o sequenciamento para confirmar a presença de *L.monocytogenes* em isolado de creme e salsicha. O autor trabalhou com o sequenciamento do gene hylA e conseguiu confirmar 24 das

50 amostras que estudou. O gene utilizado para essa confirmação foi o mesmo utilizado neste trabalho, evidenciando sua eficiência nas análises de confirmação do micro-organismo em estudo.

Isolados de *L. monocytogenes* apresentando perfis idênticos foram detectados em diferentes situações: provenientes de uma mesma amostra de produto cárneo, de produtos cárneos distintos, coletados em um mesmo estabelecimento comercial, de produtos cárneos distintos coletados em diferentes regiões do município de São Paulo; de um mesma categoria de produto cárneo coletado em diferentes regiões. Isolados de *L. monocytogenes* com perfis diferentes também foram encontrados em uma mesma amostra (ROWLANDS, 2013), resultados esses, que assemelham-se aos encontrados nesse estudo, porém deixando evidenciado que as análises envolvendo sequenciamento de DNA também podem ser aplicadas em amostras de produtos alimentícios, e não somente ambientais.

Com relação à pesquisa de genes que codificam resultados similares, ao do presente estudo, têm sido descritos, porém com genes diferentes, como o caso de MAMMINA et al. (2009) detectaram os genes inIA, inIC e inIJ em todos os 54 isolados de *L. monocytogenes*, pertencentes aos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b, provenientes de casos esporádicos de listeriose na Itália. WIECZOREC et al. (2012) verificaram 100% de positividade para esses genes em 85 isolados obtidos de carne moída bovina, sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b, assim como JAMALI et al. (2013) em 18 isolados de *L. monocytogenes*, distribuídos em três sorogrupos, obtidos de leite cru.

4.5 DADOS DO LEVANTAMENTO DOS SISTEMAS EXISTENTES PARA DIAGNÓSTICOS DE *Listeria monocytogenes* EM LABORATÓRIOS COMERCIAIS

Dos Laboratórios pesquisados somente o L10 não possui serviços de análise de *Listeria monocytogenes*. Quando questionado se utilizava PCR como método analítico, apenas um deles, realiza PCR em alimentos, mas

detecta somente *Salmonella sp* e exclusivamente em amostras oriundas de carne bovina.

Os nove laboratórios restantes executam somente análise microbiológica convencional de *L. monocytogenes*, e alegaram não ter interesse em partir para o diagnóstico molecular devido ao alto custo dos equipamentos e treinamentos para os analistas. Os dados sobre valores e tempo das duas técnicas estão descritos na tabela 3.

Tabela 3: Comparação de valores e tempo propostos por Laboratórios Particulares

LABORATÓRIO	VALOR	TEMPO TOTAL DE ANÁLISE	TÉCNICA UTILIZADA
L1	R\$ 90,00	10 dias	Microbiologia convencional
L2	R\$ 75,00	10 dias	Microbiologia convencional
L3	R\$85,00	12 dias	Microbiologia convencional
L4	R\$110,00	10 dias	Microbiologia convencional
L5	R\$ 80,00	12 dias	Microbiologia convencional
L6	R\$ 95,00	13 dias	Microbiologia convencional
L7	R\$ 100,00	10 dias	Microbiologia convencional
L8	R\$ 95,00	10 dias	Microbiologia convencional
L9	R\$70,00	11 dias	Microbiologia convencional
L10	R\$70,00	02 dias (amostra de <i>Salmonella sp</i>)	PCR

Fonte: Autoria Própria , 2015

Os benefícios e vantagens são grandes estimuladores para a escolha das técnicas moleculares. A melhoria nas análises são necessários e técnicas rápidas para economizar trabalho, tempo e custo são demanda urgente. (TANG et. al. 2009).

Com a pesquisa feita em Laboratórios particulares, observou-se poucas opções de análise de *L. monocytogenes*. Estes laboratórios foram escolhidos por estarem localizados estrategicamente para atender grande parte do Brasil. Porém constata-se, que existe uma falta de locais especializados e

profissionais treinados para executar a análise do micro-organismo, mesmo se tratando da microbiologia convencional, que é a rotineiramente utilizada.

Outro fator interessante verificado, é que somente um Laboratório fornecia diagnóstico molecular como técnica aplicada. Este, ainda ressalta que as amostras devem ser somente de carnes bovinas, suínas e ovinas, e também analisam somente *Salmonella sp.*, não avaliam presença de vários outros micro-organismos de alta periculosidade e de suma importância para a qualidade de derivados cárneos e demais alimentos.

Almeida (2010) relaciona fatores condicionantes como barreiras à adoção da técnica de diagnóstico molecular. Neste contexto, a ausência de capacitação dos profissionais, a ausência de qualificação no mercado, os procedimentos burocráticos, principalmente com relação a legislações, e a falta de recursos financeiros representam os principais para o avanço nas pesquisas com PCR.

De acordo com Rodrigues et. al. (2011), é possível observar que o diagnóstico molecular via amplificação de DNA (PCR) está em crescimento e conseqüentemente às inovações relacionadas serão notáveis nos próximos anos, com a valorização do limiar de detecção e tempo de análise. A autora citada anteriormente, enfatiza ainda, que a PCR pode ser indicada como o ato de inovação tecnológica.

Vale reforçar que a indústria deve estar atenta a esta tendência, pois pode estar elevando a credibilidade e a vantagem competitiva da empresa, pois fatores como alta confiabilidade, sensibilidade, especificidade, tempo de análise, custos, entre outros, são aspectos relevantes associados à PCR.

Uma estimativa de valores da extração de DNA e PCR executado nesta pesquisa, a fim de se comparar os valores com o apresentado pelo laboratório L10 e também como o apresentado pelos demais laboratórios. Nesses valores não estão inclusos valores dos equipamentos, nem a hora de trabalho do executor da análise, por se tratar de uma pesquisa de cunho científico. Foram expressos valores gastos somente com os reagentes utilizado e materiais descartáveis como ponteiros e luvas. Os dados foram tabulados e constam na tabela 4.

TABELA 4: Levantamento de custos dos reagentes para extração de DNA e reação de PCR

REAGENTE	VALOR COMERCIAL	VALOR GASTO
TE	R\$ 180,00	R\$ 0,10
DNTP	R\$328,00	R\$ 0,16
BUFFER	R\$ 3500,00	R\$ 1,75
PRIMER	R\$960,00	R\$ 0,96
MgCl ₂	R\$160,00	R\$ 0,24
Taq DNA polimerase	R\$ 284,00	R\$ 0,17
Marcador de Peso Molecular	R\$ 650,00	R\$ 1,95
Ponteiras 10 ul	R\$ 36,00	R\$ 0,21
Ponteiras 1000ul	R\$ 48,00	R\$ 0,10
Ponteiras 20ul	R\$ 65,00	R\$ 0,20
Luvras descartáveis P	R\$ 20,00	R\$ 0,40

Fonte: Aatoria Própria, 2015

A tabela 5 demonstra o valor total gasto na Extração de DNA e reação de PCR.

Tabela 5: Valores totais de custos na extração de DNA e reação de PCR (incluindo o Nested PCR)

CUSTO	PROCEDIMENTO
R\$ 0,10	Extração de DNA
R\$ 12,28	Amplificação de DNA (PCR)

Fonte: Aatoria Própria, 2015

Como o protocolo de extração de DNA utilizado neste experimento é de liste térmica, o custo é extremamente baixo, devido à utilização de somente um tipo de reagente, evidenciado o baixo custo da análise de PCR em comparação com a Microbiologia Convencional, pois esta demanda de muitas fases para sua confirmação e muitos meios de cultivo, tornando a análise cara e trabalhosa. O fato das análises convencionais serem trabalhosas podem ser um fator determinante para o custo elevado para sua realização.

Quando se compara o valor obtido neste estudo, com o proposto pelo Laboratório L10, os valores não são completamente diferentes, já que como

dito anteriormente, neste cálculo não foi inserido os gastos com a compra de equipamentos, nem energia elétrica, água e funcionários. Contudo, o valor expresso pelos demais laboratórios de microbiologia convencional é consideravelmente maior do que o apresentado pelo L10 de análises moleculares.

Andrade et. al. (2010) comenta que na microbiologia tradicional, diversos caldos seletivos de enriquecimento e ágaros disponíveis para recuperação e multiplicação de *L. monocytogenes* a partir de espécimes ambientais e de alimentos.

Além disso, são necessários vários testes bioquímicos para a classificação taxonômica dos isolados e confirmação do gênero para identificação da espécie, o que pode ser o responsável pelo alto custo das análises convencionais apresentados neste estudo. Andrade et. al.(2010) relata ainda, que as técnicas moleculares estarão sendo utilizadas com mais frequência com o decorrer dos tempos, a sua utilização vem contribuir com as técnicas tradicionais proporcionando, assim, diagnósticos cada vez mais precisos e em curto prazo de tempo.

Ressaltando que o diagnóstico molecular é um campo em franco avanço científico e tecnológico, no qual novas técnicas moleculares estão em desenvolvimento para o diagnóstico de bactérias em ambientes de processamento e também no produto alimentício.

Outro elemento determinante para escolha da análise de PCR para detecção de patógenos é o tempo. O único laboratório que usa esta técnica habitualmente determinou um prazo de dois dias para entrega dos resultados assemelhando-se ao tempo usado para detecção de *L.monocytogenes* neste estudo.

Sendo que um dia seria para todo procedimento de análise e o outro para dificuldades e demoras com laudos, demonstrando mais uma vez vantagem em relação a outra técnica comparada, pois as demais apresentaram prazos consideravelmente demorados.

Na técnica executada neste experimento, o tempo total envolvendo desde a etapa de extração de DNA até a demonstração do resultado final foi de 24h, o que se assemelha ao apresentado por L10.

Quando se compara o tempo de duração da análise, a PCR apresenta vantagem por ser uma técnica rápida, com cerca de 30 horas para obtenção do resultado, enquanto a microbiologia convencional pode levar de cinco a 15 dias, dependendo do micro-organismo analisado (MALDONADO, 2008).

Nas últimas décadas, a utilização das técnicas de PCR na detecção e identificação de *L. monocytogenes* tem se demonstrado eficiente, segundo vários trabalhos (MCGINNIS, 2006; ANDRADE et. al. 2010). O sucesso da PCR reforça a possibilidade da realização da análise direta em alimentos (sem isolamento de colônias), o que facilita o diagnóstico devido a redução de tempo e trabalho. (KARAHAN et. al. 2007).

O tempo da PCR é uma vantagem de destaque também para Passo (2009), que afirma levar de cinco a vinte e quatro horas para produzir um resultado de detecção, o que também é observado nesta pesquisa.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho reforçou a importância do controle e monitoramento de *L. monocytogenes* no ambiente e equipamentos no matadouro de suínos estudado, evidenciando, neste caso, que a sala onde são higienizadas as tripas para posterior processamento, são importantes pontos de disseminação de *L. monocytogenes* dentro do ambiente frigorífico. A mesa de evisceração também se mostrou como possível foco inicial de contaminação cruzada por este micro-organismo devido a presença em grande quantidade de fezes.

Outro ponto importante observado com contaminação foi que a faca utilizada pelo manipulador, apresentou resultado confirmativo para *L. monocytogenes*, evidenciando a ineficiência do processo de higienização dos equipamentos utilizados nesta unidade produtiva.

Um dos pontos cruciais deste estudo, a etapa de sequenciamento, demonstra que o setor da triparia pode ser apontado como foco inicial de contaminação na empresa, já que apresentou micro-organismos da mesma família filogenética, ou seja, apresentando 100% de similaridade na amostra coletada no setor citado, com a que se encontra nas câmaras de resfriamento.

Cabe aos profissionais diretamente ligados a Engenharia de Produção e áreas afins, o desafio de adequação de novas tendências aos princípios de segurança alimentar sustentado pelas indústrias de alimentos mais preocupadas em servir com qualidade e excelência seus clientes: os consumidores.

Esforços se dão especificamente para reduzir o tempo de detecção e aumentando a sensibilidade e especificidade da detecção de qualquer do organismo ou da toxina. As diversas metodologias baseadas na biologia molecular, vem contribuindo enormemente à segurança alimentar, tornando a pesquisa de agentes de infecções de origem alimentar mais eficiente.

REFERÊNCIAS

ABNT- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Preparo da amostra para exame microbiológico. Rio de Janeiro: ABNT, março, 1988.

ALVES, J. **PCR multiplex para detecção de *Campylobacter spp.* e *Salmonella spp.* em carne de Frango.** 2010. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos alimentos)- Programa de Pós- Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ALMEIDA, M. R. **A eficiência dos investimentos do programa de inovação tecnológica em pequenas empresas: uma integração da análise envoltória de dados e índice de Mamquist.** Tese de Doutorado em Engenharia de Produção, 273 f. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

ANDRADE, C. **Avaliação físico-química e microbiológica de linguiça toscana porcionada e armazenada em diferentes embalagens, sob condições de estocagem similares às praticadas em supermercados.** 2005. 127 f. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

ANDRADE, R.B T. GEMELLI, L.P. DALL ONDER, K. CRISTINA, T. DE BRITO, A.A.L. BARBOZA, B.G. DE BRITO. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.* E *Listeria monocytogenes*. **Arquivo do Instituto de Biológico.**, São Paulo, v.77, n.4, p.741-750, out./dez., 2010.

AUTIO, T., SÄTERI, T., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., RAHKIO, M., LUNDÉN, J., KORKEALA, H. *Listeria monocytogenes* contamination pattern in pig slaughterhouses. **Journal Food Protection**, v.63, n.10, p.1438-1442, 2000.

AZNAR, R.; ALARCÓN, B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.958-966, 2003.

BARROS, M.A.F.; BELOTI, V.; HAGA, M.M.; CAVALETTI, L.; d'OVIDIO, L.; AMORIM, F.A.; NERO, L.A. *Listeria spp.*: ocorrência em equipamentos e ambientes de processamento de carne bovina. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 25, n.4, p. 341-348, 2004.

BENETTI, T. M. **Métodos de detecção e incidência de *Listeria sp.* E *Salmonella sp.* em linguças resfriadas comercializadas no estado do Paraná.** 2009. 135f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BERRADA H., SORIANO J.M., PICO Y., MANES J., Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real time quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology** 107, p.202-206., 2006.

BORDER, P.M.; HOWARD, J.J.; PLASTOW, G.S.; SIGGENS, K.W. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v.11, p.158-162, 1990.

BOWEN S., ZANG, C., XING, D. Highly sensitive identification of foodborne pathogenic *Listeria monocytogenes* using single-phase continuous-flow nested PCR microfluidics with on-line fluorescence detection. **Microfluidics and Nanofluidics**, Volume 15, pp 161-172, 2013.

BRASIL - **ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC no. 12, de 02 de Janeiro de 2001 – Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos.**

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. O Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação, aprovado pela Resolução - RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004.** Diário Oficial da União, Brasília, 16 de set. 2004.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular no 354/2004/DCI/DIPOA.** Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil, Brasília – DF, 25 jun. 2004. p. 3, 8.

CASELANI, K. ; PRATA, L. F. ; BIZARI, P. A. ; PEREIRA, G. T. ; MARCHI, P. G. F. ; PICINATO, M. A. C. . Ocorrência de *Listeria spp.* e de *Listeria monocytogenes*, em um matadouro-frigorífico de bovinos do Estado de São Paulo. **Bioscience Journal (UFU. Impresso)**, v. 29, p. 956-961, 2013.

CASTAGNA, S. M. F.; MULLER, M.; MACAGNAN, M.; RODERBUSCH, C.R.; CANAL, C.W.; CARDOSO, M. Detection of *Salmonella spp.* from porcine origin: a comparison between a PCR method and standard microbiological techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**, v 36, p. 373-377, 2005.

CESAR, A.P.R.; M., A.J. ; P., C.S.; N., I.A.; A. F., E. S. *Listeria spp.* E *Listeria monocytogenes* NA PRODUÇÃO DE SALSICHAS TIPO HOT DOG. **Ciência Animal Brasileira (Online)**, v. 12, p. 339-352, 2011.

CHAVES, T.F.. Revisão Teórica Das Técnicas Utilizadas Na Detecção De Enterotoxinas Estafilocócicas. **Revista Ciência Equatorial**, Volume 2 - Número 1 p. 1-14. 2012.

CHEN Y, Ross WH, Gray MJ, WIEDMANN M, Whiting RC, SCOTT VN. Attributing risk to *Listeria monocytogenes* subgroups: dose response in relation to genetic lineages. **Journal Food Protection**, 69: 335-44., 2006.

CORCORAN, D.; CLANCY, D.; O'MAHONY M.; GRANT K.; HYLAND E.; SHANAGHY N.; WHYTE P.; MCLAUCHLIN J.; MOLONEY A.; FANNING S. Comparison of *Listeria monocytogenes* strain types in Irish smoked salmon and other foods. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 209: 527-34, 2006.

CRUM, N.F. Update on *Listeria monocytogenes* infection. **Current Gastroenterology Reports**, vol.4:p. 287–296, 2002.

DESTRO, M. T. Incidence and significance of *Listeria sp.* in fish and fish products from Latin America. **International Journal of food Microbiology**. V. 62, n. 3, p. 191-196, 2000.

DIEDRICH, C. ; Pozzobon, A. ; KICH, D. M. ; AGOSTINI, C. ; BUSTAMANTE FILHO, I. C. ; SOUZA, C. F. V. . Detecção de *Staphylococcus aureus* através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), em amostras de leite bovino in natura obtidas de produtores no sul do Brasil. **Alimentos e Nutrição (UNESP. Marília)**, v. 24, p. 291-296, 2013.

DYKES G.A: Physical and metabolic causes of sub-lethal damage in *Listeria monocytogenes* after long-term chilled storage at 4°C. **Journal applied microbiology**, v.87. P. 915-922, 2003.

EUSTACE, I.; MIDGLEY, J.; GIARRUSSO, C.; LAURENT, C.; JENSON, I.; SUMNER, J. An alternative process for cleaning knives used on meat slaughter floors. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, p. 23-27, 2007.

FAO/WHO. **Food hygiene basic texts**. 3ed. Rome: fao/who, 2004.

FARENZENA, R. **Aderência e atividade fibrolítica bacteriana ruminal: efeito do pH e da concentração de carboidratos solúveis**. Disponível em <<http://w3.ufsm.br/ppgz/conteudo/Defesas/Dissertacoes/RobertaFarenzena.pdf>>. Acesso em 27 jan. 2013.

FERRONATTO, A. I.. **Contaminação de carcaças e ambiente por *Listeria sp.* em diferentes etapas do abate de suínos – 2010**.Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

FIEDORUK K.; ZAREMBA, M. L. Performance Estimation of Nested PCR-Based Assays for Direct Detection of *Listeria monocytogenes* in Artificially Contaminated Materials. **Polish J. of Environ. Stud. Vol. 19, No. 2 (2010)**, 293-299.

FIGUEIREDO, V.F.;NETTO, P.O.L.C. Implementation of the haccp in the food industry. **Rev. Gestão & produção**, v.8, n.1, p.100-111, abr. 2001.

FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). **Bam: rapid methods for detecting foodborne pathogens.** Disponível em :<<http://www.fda.gov/food/scienceresearch/laboratorymethods/bacteriologicalanalyticalmanualbam/ucm109652.htm>>. Acesso em 10 mar. 2014.

FILHO, R.L.R.; GONÇALVES, G.A.M.; LIMA, E.T.de. Comparação De Métodos Para Extração De Dna Na Reação Em Cadeia Da Polimerase Para Detecção De *Salmonella Enterica* Sorovar *Enteritidis* Em Produtos Avícolas. **Revista Ciência Animal. Brasileira**, Goiânia, v. 12, n. 1, p. 115-119, jan./mar. 2011.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar.** Porto alegre: artmed, 2005, 424p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Micro-organismos patogênicos de importância em alimentos. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2008. Cap. 4, p. 33-82.

FURTINI, L.L.R.; ABREU, L.R. Utilization of haccp in food industry. **Ciência Agrotec.**,v. 30, n. 2, p. 358-363, mar./abr., 2006.

GANDRA, E.A. **Multiplex pcr para detecção de *S. Aureus*, *S. Intermedius* e *S. Hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado.** 2006. Tese (doutorado em ciência e Tecnologia agroindustrial)–Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

GANDRA, E.A.; GANDRA, T.K.V.; MELLO, W.S.; GODOI, H.S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, p.109-118, 2008.

GARCÍA-ÁLVAREZ, M.; CHAVES, F. Listeriosis: la punta del iceberg. **Medicina clínica**, v. 129, p. 216-217, 2007.

GARVIN, D. A. **Gerenciando a qualidade.** Rio de Janeiro: Qualitymark, 1992.

GERMINNI, A., MASOLA, A., CARNEVALI, P., MARCHELLI, R. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. **Food Control**, v.20, p.733-738, 2009.

GERMANO, M. L. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2003.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4 ed. São Paulo: Atlas, 1992.

GONÇALVES, J. Princípios tecnológicos aplicados ao processamento de embutidos cárneos. **Boletim do centro de tecnologia da carne do ITAL**. V. 13, n. 1, 2003. P. 6-8.

ICMSF. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. ***Listeria monocytogenes***. **Microorganismos de los alimentos – características de los patógenos microbianos**. Zaragoza: acribia, 1998. 606 p.

JAMALI, H., RADMEHR, B., THONG, K.L.. Prevalence, characterisation, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks. **Food Control** vol 34, 121–125, 2013.

JAY, J. M. LOSSNER, M. J., GOLDEN, D. A. . Indicators of food microbial quality and safety Modern food microbiology. **Bekerly: springer**, p.387-409, 2005.

KARAHAN, M.; CETINKAYA, B. Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 428-431, 2007.

LAKATOS, E M., MARCONI, M. A. **Fundamentos de metodologia científica**. São Paulo: Atlas. 6ª. Ed, 2005.

LANGE, C; PERES, ND; ARCURI, EF; et al. Identificação de *Listeria monocytogenes* pela reação em cadeia da polimerase. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, vol. 60, p. 150-153, 2005.

LI, Y. ET AL. Determination of foodborne pathogenic bacteria by multiplex pcr microchip capillary electrophoresis with genetic algorithm-support vector regression optimization. **Analytica Chimica Acta**, v. 643, p. 100-107, 2009.

LOPES, R. P. **A importância da higiene pessoal em um Programa de Boas Práticas de Fabricação**. Monografia do Programa de Pós Graduação em Vigilância em Saúde e Defesa Sanitária Animal, 40f. Universidade Castelo Branco, Campo Grande, 2008.

LOTFOLLAHI, L.; POURNAJAFIA, GHOLAMREZALRAJIAN, NOWROUZI, J. Polymerase chain reaction(PCR4)- based detection of hly na plc-a genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy and meat products in Iran. **African Journal of microbiology research**, vol. 8, p. 1098-1101, 2014.

MACIEL, T. E.F.; FREIRE, M. C. M. ; ALMEIDA, A. M. R. ; OLIVEIRA, L. O. . Molecular characterization of beta-tubulin from *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, p. 354-358, 2010.

MALDONADO, A. G. **Ocorrência de *Salmonella spp.* em amostras de frango obtidas em uma feira e um mercado municipal da zona oeste da cidade de São Paulo: Uma análise crítica entre técnica convencional em meios de cultura e reação em cadeia pela polimerase-PCR. 2008. 75f.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MAMMINA. C.; ALEO, A., ROMANI, C., PELLISIER, N., NICOLETTI, P., PECILE, P., NASTASI, A., PONTELLO, M.M.. Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolates from Human Listeriosis Cases in Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, vol.47, p. 2925–2930, 2009.

MARKKULA, A.; AUTIO, T.; LUNDÉN, J.; KORKEALA, H. Raw and processed fish show identical *Listeria monocytogenes* genotypes with pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 6, p. 1228-1231, 2005.

MARINELLO, M.; FREITAS, E. I.; LEMOS, A. A. de; MARIN, V. A. Validação de métodos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 1073-1083, 2006.

MARINELLO, M. **Rompimento celular**. Disponível em <<http://www.ebah.com.br/rompimento-celular-doc-a28419.html>>. Acesso em 27 jan. 2014.

MARZOCCA, M. A.; MARUCCI, P. L.; SICA, M. G.; ALVAREZ, E. E. Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras ambientales de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de bahía blanca (Argentina). **Revista Argentina de microbiología**, v. 36, p. 179-81, 2004.

MATARAGAS, M., SKANDAMIS, P., NYCHAS, G.J. E., DROSINOS, E. H. Modeling and predicting spoilage of cooked, cured meat products by multivariate analysis. **Meat Science**, v. 77, 2007, 348-356.

MCGINNIS, L. **New methods for detecting listeria**. In: **u.s. department of agriculture**. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/is/pr/2006/061012.htm>>. Acesso em: 09 mai 2013.

MENEZES, M. F. S. C. ; SIMEONI, C. P. ; BORTOLUZZI, D. ; HUERTA, K. ; ETCHEPARE, M. A. ; MENEZES, C. R. . Microbiota e conservação do leite. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, p. 13-21, 2014.

MILANI, L.; FRIES, L. PAZ, P., BELLÉ, M.; TERRA, N. Bioproteção de linguiça de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V. 23, 2003. P. 161-166.

MONTEIRO, F. C. ; SAMULAK, R. L. ; MONTANHINI, M. T. M. ; BITTENCOURT, J. V. M. . Occurrence of *Listeria monocytogenes* in a slaughterhouse-fridge of pigs in the region of Campos Gerais - PR. **Revista GEINTEC: Gestao, Inovacao e Tecnologias**, v. 4, p. 1583-1593, 2014.

MONTEIRO, F. C.; MONTANHINI, M. T. M. ; BITTENCOURT, J. V. M. . Avaliação de protocolos de extração de DNA genômico na verificação da presença de *Listeria monocytogenes* por PCR. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, p. 141, 2014.

MORETRO, T.; LANGSRUD, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. **Biofilms**, v. 1, n. 2, p. 107- 121, 2004.

NALÉRIO, É.S.; ARAÚJO, M.R. de; MENDONÇA, K.S.; BASSANI, M.T.; SILVA W.P. da. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 29: 626-630, 2009.

NWACHUKWU, N.C.; ORJI, F.A. Studies on the Isolation of *Listeria monocytogenes* from Food, Water, and Animal Droppings: Environmental Health Perspective. **Environmental Health – Emerging Issues and Practice** p.180- 194, 2012.

OLIVEIRA, S.D.; SANTOS, L.R.; SCHUCH, D.M.T.; SILVA, A.B.; SALLE, C.T.P.; CANAL, C.W. Detection and identification of Salmonellas from poultry-related samples by PCR. **Veterinary microbiology**, v.87, p.25-35, 2002.

ORDONEZ, J.A. et al. **Tecnologia de Alimentos**.v. 2. Porto Alegre: Artmed, 2005. 294p.

PARDI ET AL. **Ciência, higiene e tecnologia da carne – tecnologia da carne e de subprodutos**. Processamento tecnológico. V.ii. Goiânia: editora de UFG, 1996. P. 215.

PARISI, A.; LATORRE, L.; NORMANNO, G.; MICCOLUPO, A.; FRACCALVIERI, R.; LORUSSO, V.; SANTAGADA, G.. Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence typing for high resolution genotyping of *Listeria monocytogenes* from foods and the environment. **Food Microbiology**, vol. 27, p.101-108, 2009.

PASCHE, I.M.; FERREIRA, G.M.V.. Gestão Da Qualidade Nas Agroindústrias: Um Estudo Exploratório No Município De Marau-RS. **Revista Extensão Rural**, vol 1, p.01-32, 2010.

PASSO, M. do C. S. U. da C. **Avaliação de métodos moleculares para avaliação da qualidade e da segurança microbiológicas em produtos alimentares**. 2009. 53f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

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.

PERES, N. D. **Detecção de *Listeria monocytogenes* em leite: Sensibilidade e Especificidade da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**. 2007. 43f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

PETTINATI, N.N. et.al.. *Listeria monocytogenes* in hot dog sausages obtained from groceries stores in the city of São Paulo – a comparative and retrospective analysis of human listeriosis isolates. **Revista Veterinária e Zootecnia**. v.13, n.2, p. 182-191, 2006.

PINTO, B.; CHENOLL, E.; AZNAR, R. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 340-352, 2005.

PRENDERGAST, D. M.; ROWE, T. A.; SHERIDAN, J. J. Survival of *Listeria innocua* on hot and cold beef carcass surfaces. **Journal of applied microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2721-2729, 2007.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Família enterobacteriaceae. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap. 18, p. 115-130.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA A.J.P. **Patologia aviária**. Manole: Barueri, 2009. P.34-66.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. et al. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. **Trends Food Sci. Tech.**, Amsterdam, v. 18, p. 306-319, 2007.

RODRIGUES, M. X.; BITTENCOURT, J.M.V ; MATOS, E. A. S. A. ; REIS, D. R. . Inovação em métodos analíticos microbiológicos na indústria de alimentos. **Latin American Journal of Business Management**, v. 2, p. 69-81, 2011.

RODRIGUES, M. X. **Proposta de inovação tecnológica no controle de qualidade da produção agroindustrial**. 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2013.

ROWLANDS, R.E.G. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Listeria monocytogenes* isoladas de produtos cárneos crus comercializados no município de São Paulo**. 2013. 121f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, 2013.

ROÇA, R. O. **Microbiologia da carne**. Unesp, Campus de Botucatu, 2004. Disponível em: <http://www.fca.unesp.br/outros/tcarne/tecarne.htm>. Acesso em: 23.mai. 2013.

ROSA, D. D. Método rápido de detecção de bactérias. **Revista Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 3, p. 259-261, 2008.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.184-204, 1987.

SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J. Incidence and principal sources of *Listeria* spp. And *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. **Food microbiology**, v. 16, p. 465-477, 1999.

SANTOS, V. D. ; MELLO, J.F. ; CEZAR, G. S. ; GELATTI, L. C. ; COSTA, M. . Susceptibilidade de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de produtos lácteos no Rio Grande do Sul frente a diferentes desinfetantes. **Revista FASEM Ciências**, v. 3, p. 100-111, 2013.

SASAHARA, K. C.; ZOTTOLA, E. A. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. **Journal of food protection**, v. 56, n.112, p.1022-1028, 1993.

SCHITTLER, L. **Caracterização molecular e sorotipificação de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* isoladas em matadouro - frigorífico de suínos da região das Missões – RS**. 2005. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

SHI, L,WU, F., WEN, Y., ZHAO, F., XIANG, J., MA, L. A novel method to detect *Listeria monocytogenes* via superparamagnetic lateral flow immunoassay. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Vol. 407, p. 529-535, 2015.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**, 1º edição – São Paulo: Livraria Varela, 2001.

SILVEIRA, J.G. **Investigação de *Listeria sp.* e micro-organismos mesófilos totais em carcaças bovinas e em ambiente industrial de abatedouro**. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

SOUZA, S. M. O.; I. S.; CARVALHO, A. FERNANDES ; NERO, L. A. ; FERREIRA, M. DE A. . Using Nested PCR To Detect the *hlyA* Gene of *Listeria monocytogenes* in Minas Frescal Cow's Milk Cheese. **Journal of Food Protection**, v. 75, p. 1324-1327, 2012.

TALON, R.; LEBERT,A.; LEROY, S.; GARRIGA, M.;AYMERICH,T.; DROSINOS, E.; ZANARDI,E.; IANIERI, A.; FRAQUEZA, M.; PATARATA, L.; LAUKOVA, A. Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in mediterranean countries and slovakia. 1: microbial ecosystems of processing environments. **Meat science**. v. 77, p. 570-579, 2007.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR S. MEGA4: **Molecular Evolutionary Genetics Analysis** (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v.24, p.1596-1599, 2007. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>).

TANG, Y. et al. Rapid detection techniques for biological and chemical contamination in food: A review. **Internacional Journal of Food Engineering**, v.5, issue 4, p.1-13, 2009.

TAKHISTOV, P.; GEORGE, B. Early events and pattern formation in *Listeria monocytogenes* biofilms. **Biofilms**, v.1, p.351-359, 2004.

THEVENOT, D.; DERBURG, A.; VERNZOZY-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.

TOLEDO, J. C. **Gestão da qualidade na agroindústria**. In: Batalha, m. O. *Gestão Agroindustrial*. São Paulo : Atlas, 1997. Vol. 1, cap. 8.

TOLEDO, J.C; BATALHA, M.O; AMARAL, D.C. Qualidade na indústria agroalimentar: situação atual e perspectivas. **Revista de administração de empresas**. São Paulo, v 40, n2, p.90-101, 2000.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: Improving the sensibility of progressive sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Research**, v.22, p.4673-4680, 1994.

UHITIL, S.; JAKI, S.; PETRAK, T.; MEDI, H.; GUMHALTER-KAROLYI, L. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria spp.* In cakes in croatia. **Food control**, v. 15, n. 3, p. 213-216, 2004.

VARNAM, A. H. **Foodborne pathogens**. St. Louis: mosby year book, 1991. P.557.

VÁZQUEZ-SALINAS, C.; RODAS-SUÁREZ, O.; QUIÑONES-RAMÍREZ, E. I. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico City. **Food microbiology**, v. 18, n. 2, p. 177-181, 2001.

VON LAER, A., **Mapeamento da contaminação por *Listeria monocytogenes* em uma planta de processamento de linguiça mista frescal através de sorologia e PFGE. Pelotas**, 2004.79f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2004.

VON RÜCKERT, D. A. S. **Comparação dos métodos microbiológico convencional, imunoanálise e reação da polimerase em cadeia (PCR) no monitoramento de *Salmonella spp.* Em frangos de corte durante o abate.** Viçosa, 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2006.

ZANQUETTA, E.B.; MORAIS, J. F.; Frausto, H.E.G.; Silvério, K.I. ; Yamaguchi, M.U. . Qualidade Microbiológica de Alimentos: Pesquisa de *Salmonella sp.* e *Listeria sp.* **Rama: Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 6, p. 1, 2013.

WARRINER, K.; NAMVAR, A. What is the histeria with *Listeria sp.*? **Food Sience and Techonology**, v.20, p.245-254, 2009.

WHO/FAO. WORLD HEALTH ORGANIZATION/FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods.** 2004. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/mra4.pdf>>.

WIECZOREK K, DMOWSKA K, OSEK J. Characterization and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from retail beef meat in Poland. **Foodborne Pathog Dis**, vol.9, p.681-685, 2012.

ANEXO A - MONTEIRO, F. C. ; MONTANHINI, M. T. M. ; BITTENCOURT, J. V. M. . Avaliação de protocolos de extração de DNA genômico na verificação da presença de *Listeria monocytogenes* por PCR. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, v. 8, p. 141, 2014.

Avaliação de protocolos de extração de DNA genômico na verificação da presença de *Listeria monocytogenes* por PCR

Francielli Casanova Monteiro¹, Maike Taís Maziero Montanhini², Juliana Vitoria

Messias Bittencourt^{3*}

Resumo: *Listeria monocytogenes* é um patógeno transmitido por alimentos que pode causar sérias doenças, principalmente em indivíduos imunodeprimidos. A identificação rápida e precisa desta bactéria nos alimentos é uma grande aliada na prevenção da sua transmissão. Os métodos moleculares têm se mostrado efetivos no que se refere a estes quesitos, no entanto, ainda é difícil determinar a melhor técnica de extração do DNA em função das características de cada micro-organismo. A eficiência da PCR depende de DNA em quantidade e qualidade satisfatórios. O presente trabalho teve por objetivo avaliar duas técnicas de extração de DNA, uma por detergente CTAB e outra por lise térmica. Foram utilizadas quatro cepas de *L. monocytogenes*, sendo uma ATCC 19117 e três isoladas de ambiente industrial (ralos de um frigorífico), previamente identificadas por métodos convencionais e confirmadas por métodos moleculares. A extração por lise térmica apresentou resultados satisfatórios, proporcionando a visualização de bandas visíveis e sem interferentes na reação de PCR. A lise térmica mostrou-se um bom protocolo de extração, pois além de fornecer DNA na quantidade e qualidade necessária para a amplificação, é uma técnica simples, rápida e barata. **Palavras-chave:** Métodos moleculares; microbiologia; detergente CTAB; lise térmica.

Introdução

O gênero *Listeria* compreende seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. grayi* (Liu, 2006). São bactérias resistentes a grandes variações de pH, temperatura e concentrações salinas; em função destas características, podem estar presentes em ampla variedade de ambientes, incluindo solo, água, efluentes e alimentos (Gandhi et al., 2007). Somente duas espécies do gênero são consideradas patogênicas, *L. monocytogenes* para o homem e outros animais e *L. ivanovii* para outros mamíferos (Liu, 2006). A doença causada no homem inclui infecções severas, como septicemias, encefalite, meningite e aborto, com altas taxas de

hospitalizações e mortes. Acomete principalmente pessoas idosas, recém-nascidos, gestantes e indivíduos imunocomprometidos (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

A listeriose em humanos, apesar de apresentar menor incidência em comparação com outras doenças veiculadas por alimentos, tem sido responsável por até um terço dos óbitos em decorrência desse grupo de enfermidades (EFSA, 2013). Os casos de listeriose em humanos são causados quase que exclusivamente por *L. monocytogenes*, portanto essa espécie tem sido o foco dos critérios microbiológicos em legislações concernentes à inocuidade dos alimentos. O parâmetro ausência de *L. monocytogenes* tem sido adotado, de acordo com o país, para alimentos de pronto consumo em geral, ou apenas para aqueles que serão consumidos por grupos de risco, ou que propiciam a multiplicação da bactéria (Yang et al., 2006; EFSA, 2013).

Os métodos tradicionais de isolamento de *L. monocytogenes*, aprovados por agências regulamentares, requerem vários dias para serem concluídos, pois exigem enriquecimento seletivo, plaqueamento em meios seletivos e confirmação bioquímica dos isolados (Gasarov et al., 2005).

Vários métodos envolvendo genes estão sendo utilizados com êxito na tipagem molecular de *L. monocytogenes* (Parisi et al., 2010; Destro, 2000). De acordo com Corcoran et al. (2006), o ajuste de técnicas envolvendo os processos fenotípicos com genotípicos tende a ser benéfico na averiguação de ocorrências de surtos de listeriose, já que os fenotípicos são úteis para uma primeira despistagem, relativamente à vicência de relação de afinidade entre estirpes, e os genotípicos para a sustentação das relações existentes. Dentre as técnicas existentes, destaca-se a PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase), a qual tornou-se o método genético mais conhecida e utilizada em diagnóstico microbiológico (Malorny et al., 2003).

Uma das etapas decisivas nas análises moleculares é o isolamento do DNA bacteriano em quantidade e qualidade suficiente para amplificação pela PCR. Para extração de DNA podem ser empregados vários procedimentos de rompimento da parede celular em bactérias, que podem ser classificados em métodos enzimáticos, químicos, não-mecânicos e mecânicos (Persson et al., 2011). No entanto, há uma grande diferença na quantidade e na qualidade do

DNA obtido em função da técnica de extração utilizada (Quigley et al., 2012). A extração e purificação do DNA bacteriano é uma etapa fundamental para o sucesso da reação de PCR, considerando que os alimentos, assim como outras amostras orgânicas, apresentam grande quantidade de inibidores, que interferem diretamente na amplificação do DNA (Liu, 2008).

Existem diversos métodos para a extração do DNA a ser utilizado nas análises moleculares, o que dificulta a escolha de um protocolo padrão. O presente trabalho tem por objetivo avaliar o uso de duas metodologias para isolamento de DNA genômico de *L. monocytogenes*, de modo a estabelecer um protocolo eficiente na identificação deste micro-organismo.

Material e Métodos

Para a realização deste experimento foram utilizadas 4 cepas de *L. monocytogenes*, sendo uma cepa ATCC 19117 e três isoladas de ambiente industrial (ralos de um frigorífico), previamente identificadas por métodos convencionais e confirmadas por métodos moleculares.

As amostras foram incubadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa - PR, em caldo BHI a 37 °C por 18h, 24h e 36h para determinação do tempo ideal de incubação. Logo após, foram encaminhadas para o Laboratório de Bioengenharia do mesmo Campus, para posterior extração de DNA e reação de PCR.

Extração de DNA

Foram testados dois protocolos de extração de DNA bacteriano, um deles utilizando CTAB e outro utilizando a técnica de lise térmica.

Extração com detergente CTAB

Para extração de DNA das cepas bacterianas, utilizou-se o protocolo proposto por Olindo et al. (2009), no qual uma quantidade de 2,5 mL de amostra foram precipitados em tubos de microcentrífuga com 1,7 mL por meio de um pulso de centrifugação a 14.000 rpm. O sobrenadante foi eliminado e este processo foi repetido até que todo o volume (2,5 mL) fosse precipitado. Ao pellet obtido foram adicionados 700 mL de tampão de extração (1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20mM EDTA, pH8,0; PVP-40 1%; CTAB 2%;

Proteinase K, 20mg/mL; δ -Mercaptoetanol 0,2%). A solução foi misturada em vórtex e incubada por 30 minutos a 65°C em banho-maria, sendo misturada com o cuidado de não se fazer movimentos bruscos a cada 10 minutos. Foram acrescentados 650 μ L de clorofórmio:álcool-isoamílico (24:1), a solução foi homogeneizada até formar uma emulsão e centrifugada a 14.000 rpm durante 7 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionada de 200 μ L de tampão de extração sem Proteinase K, homogeneizado, e adicionados então 650 μ L de clorofórmio:álcool-isoamílico (24:1), homogeneizada novamente e centrifugada a 14.000 rpm por 7 minutos. O processo com 650 μ L de clorofórmio:álcool-isoamílico (24:1) foi repetido por mais duas vezes até que a fase aquosa adquirisse aparência translúcida. O DNA foi precipitado com 1 volume de Isopropanol conservado em temperatura ambiente, homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm durante 7 minutos. O sobrenadante foi então removido e a superfície do precipitado foi lavada por duas vezes com 70 mL de etanol 70%, preparado um pouco antes do uso. A cada lavagem o precipitado foi centrifugado por 2 minutos a 14.000 rpm. Em seguida o pellet foi seco em temperatura ambiente por 30 minutos e ressuspendido em 40 μ L de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0 + 10 mg/ μ L de RNase) e deixado em banho-maria a 37°C por 30 minutos.

Extração por lise térmica

Para o procedimento de extração de DNA, seguiu-se o protocolo utilizado por Peres et al. (2010), utilizando o método de lise térmica com adaptações. Transferiu-se 2 ml de cada amostra para um microtubo estéril. Após centrifugação a 5.000 rpm durante 4 minutos, o sobrenadante foi desprezado, o pellet foi lavado três vezes com 500 μ L de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,8) e submetido a uma centrifugação por dois minutos a 5.000 rpm. O pellet foi suspenso novamente em 100 μ L de TE e mantido no banho seco, com temperatura de 98° por 10 minutos. Em seguida foi feita centrifugação a 12.000 g durante 30 segundos e o sobrenadante foi estocado a -20°C para posterior utilização.

Reação da PCR

Para a reação de PCR, seguiu-se o protocolo descrito por Peres et al. (2010) com adaptações devido a marcas de reagentes e também equipamentos. A reação denominada “mix”, continha 1 µl de cada primer (10 µM), 5 µl de tampão de PCR 10 X, 1,5 µl de MgCl₂ (50mM), 1 µl da mistura de nucleotídeos (10 mM), 0,2 U de Taq polimerase, 3ul de DNA bacteriano e água Milli-Q para completar um volume de 25 µl. As condições de amplificação foram: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos à temperatura de anelamento dos primers, que foi 50°C e 45 segundos a 72°C, e uma extensão final de 5 minutos a 72°C, como descrito por Aznar e Alarcón (2003). Como controle positivo da reação, utilizou-se DNA extraído da amostra de *L. monocytogenes* ATCC 19117, e como controle negativo, água Milli-Q esterilizada. Os *primers* utilizados na reação estão descritos na Tabela 1.

Tabela 2 - Primers utilizados na reação da PCR para identificação de *Listeria monocytogenes*

Primers	Gene-alvo	Produto amplificado (pb)	Referência
CCTAAGACGCCAATCGAA	hlyA F	702pb	Border et al. (1990)
AAGCGCTTGCAACTGCTC	hlyA R		

Fonte: Autoria Própria, 2014

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose, aproximadamente uma hora utilizando-se 70 volts. O gel de agarose foi submerso em solução de brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL, por 10 minutos e fotodocumentados em transiluminador ultravioleta utilizando software LpiX Image para a visualização das bandas. Utilizou-se marcador de peso molecular de 100 pb para estimativa do tamanho dos produtos de PCR.

Resultados e Discussão

O tempo ideal de incubação das cepas em caldo BHI foi de 24h a 37 °C. O Período de 18h mostrou-se ineficiente, uma vez que a cultura não atingiu a fase estacionária da curva de crescimento, não produzindo assim a massa celular necessária para a extração do DNA na quantidade necessária. Silva (2010), disserta que ao inocular *L. monocytogenes* em meio líquido de BHI à 37 °C, observa-se uma turvação no meio somente após 18-24 h.

O período de 36h também se mostrou eficiente neste estudo; o mesmo resultado foi relatado Cesar et al. (2011). No entanto, este tempo de incubação pode ser considerado uma desvantagem quando se procura rapidez no resultado, uma vez que, como observado anteriormente, com 24 horas consegue-se uma boa quantidade de biomassa para realização das análises de PCR.

A quantidade de massa celular é importante para facilitar a extração do DNA na quantidade e qualidade necessária para a reação de PCR. Avaliando-se os protocolos de extração testados, verificou-se que o produto da extração de DNA por CTAB apresentou pouca quantidade e qualidade para a reação de PCR. Resultados semelhantes foram observados por Mesquita et al. (2001) que utilizou protocolo com CTAB e a proteinase K, apresentando baixa quantidade de DNA e alta quantidade de proteína. Esse fato pode representar a causa mais provável da não amplificação pela PCR do DNA obtido com esta metodologia de extração.

No entanto, a extração por lise térmica apresentou DNA em quantidade e qualidade satisfatórios para a amplificação pela reação de PCR (Figura 1). Produtos de PCR de boa qualidade a partir de lisado celular de *L. monocytogenes* já foram descritos em outros estudos (Fluit et al., 1993; Aznar & Alarcón, 2003; Aslam et al., 2003; Ripjens & Herman., 2004). A extração por lise térmica é mais rápida e simples, por utilizar pequenas quantidades de soluções-tampão, sendo assim mais econômica, oferecendo menos riscos à saúde do manipulador e causa menos impactos ao meio ambiente (Garcia et al., 2008).

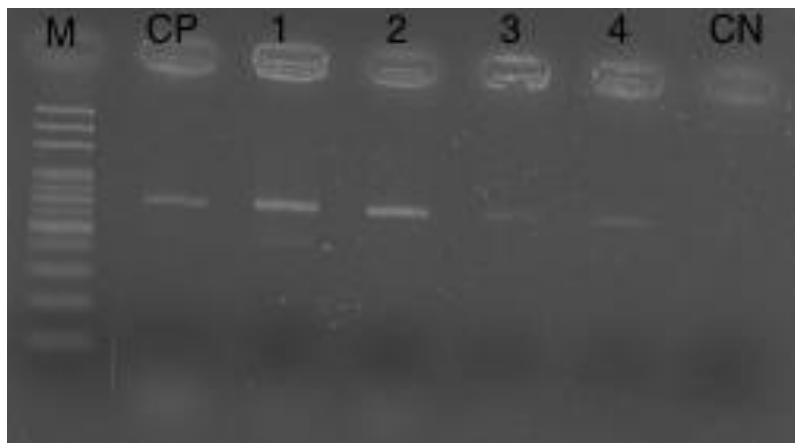


Figura 1 - Produtos de amplificação de 702pb, específicos de *L. monocytogenes*, obtidos pelo método de extração de DNA por lise térmica (M: marcador de peso molecular; CP: controle positivo, 1,2,3,4: amostras, CN: controle negativo).

Fonte: Autorial Própria, 2015.

Flôres et al. (2003) comparam dois métodos de extração de DNA – a extração por tratamento térmico e a técnica de extração pelo CTAB – em amostras de 100 ovos de galinha contaminados artificialmente com uma cepa de *L. monocytogenes*. O material obtido com as extrações foi submetido a PCR. Comparando os métodos de extração, observou-se diferença na capacidade de detecção, considerando o método com CTAB eficaz, mas com baixa quantidade de DNA, assemelhando-se ao resultado encontrado nesta pesquisa.

Em outro estudo conduzido por Germini et al. (2009) os autores descrevem quatro diferentes procedimentos de extração de DNA para detecção de *L. monocitogenes* e *E. coli* em ovos. O melhor desempenho descrito pelos autores também foi o do método que utiliza a lise celular térmica.

Brankica et al. (2011) constata que a PCR é um método rápido e eficiente na detecção de *L. monocytogenes*, mas cuja aplicação correta a amostras de alimentos está limitada, por estes terem geralmente baixas concentrações de agentes patogénicos, populações bacterianas heterogéneas e elevados volumes de matriz de alimento que contêm substâncias que podem inibir alguns dos compostos da reação de PCR .

A PCR destaca-se como técnica complementar, já que é utilizada na confirmação de resultados, o que é muito comum nas pesquisas científicas.

Nestes casos, as técnicas convencionais são utilizadas nas etapas iniciais da pesquisa e a PCR substitui a identificação bioquímica por ser mais rápida e confiável. Além da técnica de PCR apresentar maior sensibilidade que a identificação bioquímica, o tempo de análise é reduzido significativamente, o que é de grande interesse para a indústria de alimentos (Frece et al., 2010).

Atualmente são encontrados no mercado diversos kits para extração com bons resultados no que se refere a qualidade e quantidade de DNA, facilitando muito a rotina no laboratório (Quigley et al., 2012). No entanto, estes kits ainda apresentam elevado custo, inviabilizando muitas vezes a análise em laboratórios de rotina.

Estudos que confirmem a eficiência da metodologia para extração do DNA bacteriano facilitam a escolha por pesquisadores no momento de implementar uma metodologia e contribuem para o desenvolvimento da técnica de PCR como ferramenta no controle de qualidade na indústria de alimentos.

Conclusão

As técnicas moleculares estão cada vez mais presentes nos laboratórios de controle de qualidade bem como em laboratórios de pesquisa na área de alimentos, pois já comprovaram ser alternativas viáveis e confiáveis no diagnóstico de patógenos. No entanto, o sucesso da detecção depende da escolha correta de protocolos de análise. A extração do DNA bacteriano é uma etapa fundamental deste processo e a escolha do protocolo ideal pode levar tempo.

A extração do DNA de *L. monocytogenes* por lise térmica se mostrou eficiente, favorecendo a amplificação durante a PCR. Além disso, trata-se de uma metodologia simples, rápida e barata, o que viabiliza sua utilização na rotina de um laboratório.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES pelo financiamento da pesquisa e aos colaboradores do Laboratório de Bioengenharia da UTFPR, Ponta Grossa-PR, pelo auxílio na execução das análises.

Referencias

ASLAM, M; HOGAN, J; SMITH, KL. Development of a PCR-based assay to detect Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in milk. Food Microbiology, v.20, p.345-350, 2003.

AZNAR, R; ALARCÓN, B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. Journal of Applied Microbiology. v.95, n.5, p.958-966, 2003.

BORDER, P.M.; HOWARD, J.J.; PLASTOW, G.S.; SIGGENS, K.W. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. Letters in Applied Microbiology, v.11, n.3, p.158-162, 1990.

BRANKICA, L.; STJEPANOVIC, A.; TOLINACKI, M.; GOLIC N.; TOPISIROVIC L. Improved sensitivity and reproducibility of the PCR method for detection of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in milk. Acta Veterinaria, v.61, n.2-3, p.239-245, 2011.

CESAR, A.P.R.; MESQUITA, A.J.; PRADO, C.S.; NUNES, I.A.; ALMEIDA FILHO, E.S. *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* na produção de salsichas tipo hot dog. Ciência Animal Brasileira, v.12, n.2, p.339-352, 2011.

CORCORAN, D.; CLANCY, D.; O'MAHONY M.; GRANT K.; HYLAND E.; SHANAGHY N.; WHYTE P.; MCLAUCHLIN J.; MOLONEY A.; FANNING S. Comparison of *Listeria monocytogenes* strain types in Irish smoked salmon and other foods. International Journal of Hygiene and Environmental Health, v.209, n.6, p.527-534, 2006.

DESTRO, M.T. Incidence and significance of *Listeria* in fish and fish products from Latin America. International Journal of Food Microbiology, v.62, n.3, p.191-196, 2000.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2011. EFSA Journal, v.11, n.4, a.3129, 2013.

FLÔRES, M.M.; NASCIMENTO, V.P.; CARDOSO, M.; SANTOS, L.R.; LOPES, R.F.F.; WALD, V.B.; BARBOSA, T.M.C. Análise da contaminação por *Salmonella* em ovos do tipo colonial através da reação em cadeia da Polimerase. Ciência Rural, v.33, n.3, p.553-557, 2003.

FLUIT, A.C.; TORENSMA, R.; VISSER, M.J.C. Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. Applied Environmental Microbiology, v.59, n.5, p.1289-1293, 1993.

FRECE, J.; MARKOV, K.; CVEK, D.; KOLAREC, K.; DELAS, F. Comparison of conventional and molecular methods for the routine confirmation of *Listeria monocytogenes* in milk products produced domestically in Croatia. Journal of Dairy Research, v.77, n.1, p.112-116, 2010.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. International Journal of Food Microbiological. v.113, n.1, p.1-15, 2007.

GARCIA, P.M.; ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.C.; BRITO, J.R.F.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Detecção de *Escherichia coli* 0157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru por método convencional e PCR multiplex. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.60, n.5, p.1241-1249, 2008.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P.M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. FEMS Microbiology Reviews, v.29, n.5, p.851-75, 2005.

GERMINI, A.; MASOLA, A.; CARNEVALI, P.; MARCHELLI, R. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O175:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. *Food Control*, v.20, n.8, p.733-738, 2009.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, v.55, n.1, p.645-59, 2006.

LIU, D. Preparation of *Listeria monocytogenes* specimens for molecular detection and identification. *International Journal of Food Microbiology*. v.122, n.3, p.229-242, 2008.

MALORNY, B.; TASSIOS, P.T.; RÅDSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, v.83, n.1, p.39-48, 2003.

MESQUITA, R.A; ANZAI, E.K.; OLIVEIRA, R.N.; NUNES, F.D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para a amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. *Pesquisa Odontologica Brasileira* v.15, n.4, p.314-319, 2001.

OLINDO, C.S.; CHAPAVAL L.; VILLARROEL, A.B.S.; ALVES, F.S.F.; SOUSA, F.G.C.; FERNANDES, F.E.P.F.; ALVES, F.S.F; SOUSA, F.G.C.; FERNANDES, F.E.P. Detecção de *Staphylococcus aureus* utilizando a técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.38, n.7, p.1317-1321, 2009.

PARISI, A.; LATORRE, L.; NORMANNO, G.; MICCOLUPO, A.; FRACCALVIERI, R.; LORUSSO, V.; SANTAGADA, G. Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence typing for high resolution genotyping of *Listeria monocytogenes* from foods and the environment. *Food Microbiology*, v.27, n.1, p.101-108, 2010.

PERES, N.D.; LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; ARCURI, E.F.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR em leite contaminado artificialmente. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.62, n.4, p.973-979, 2010.

PERSSON, S.; BOER, R.F.; KOOISTRA-SMID, A.M.D.; OLSEN, K.E.P. Five commercial DNA extraction systems tested and compared on a stool sample collection. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v.69, n.3, p.240-244, 2011.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; BERESFORD, T.P.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; COTTER, P.D. A comparasion of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. Journal of Applied Microbiology. v.113, n.1, p.96-106, 2012.

RIJPENS, N; HERMAN, L. Comparison of selective and nonselective primary enrichments for the detection of *Listeria monocytogenes* in cheese. Journal of Food Microbiology, v.94, n.1, p.15-22, 2004.

SILVA, A.C.M. A influência do tempo de refrigeração na virulência inicial de *Listeria monocytogenes*. 2010. 64p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar). Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, Portugal , 2010.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. Microbes and Infection, v.9, n.10, p.1236-1243, 2007.

YANG, Y.; SU, X.; YUAN, Y.; KANG, C.; LI, Y.; ZHANG, W.; ZHONG, X. Detection of *Staphylococcus aureus* in dairy products by Polymerase Chain Reaction assay. Agricultural Science in China, v.6, n.7, p.857-862, 2007.

ANEXO B - MONTEIRO, F. C. ; SAMULAR, R. L. ; MONTANHINI, M. T. M. ;
BITTENCOURT, J. V. M. . Occurrence of *Listeria monocytogenes* in a
slaughterhouse-fridge of pigs in the region of Campos Gerais - PR. Revista
GEINTEC: Gestão, Inovação e Tecnologias, v. 4, p. 1583-1593, 2014

OCORRÊNCIA DE *Listeria monocytogenes* EM ABATEDOURO-FRIGORIFICO DE SUÍNOS DA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS – PR

Resumo

Listeria monocytogenes é um micro-organismo que está vastamente propagado no ambiente. A contaminação por este patógeno pode ser considerada um problema de saúde pública pois se consumido por gestantes e idosos pode levar o indivíduo a óbito, e o mesmo tem a habilidade de sobreviver mesmo com a aplicação dos sanitizantes recomendados pela legislação vigente. Como alternativa à microbiologia convencional utilizada nas indústrias de alimentos, os métodos envolvendo biologia molecular vem se tornando cada vez mais utilizados, principalmente pelo fato destes apresentarem menor custo da análise, maior sensibilidade, especificidade e rapidez. Objetivou-se neste estudo analisar a ocorrência de *L. monocytogenes* em ambiente de abatedouro-frigorífico de suínos localizado na Região dos Campos Gerais – PR, através do método de PCR. A pesquisa foi realizada em um abatedouro-frigorífico de suínos e fábrica de embutidos que atua sob o serviço de inspeção do Paraná, para produtos de origem animal SIP/POA. A empresa localizada na região dos Campos Gerais, Paraná, possui capacidade de abate média diária de 400 suínos/dia e produção diária de embutidos correspondente a 1,5 toneladas. As amostras foram coletadas utilizando a técnica de esfregaço de superfície (Swab). 21 amostras coletadas no estabelecimento estudado, 3 tiveram respostas confirmativas para *L. monocytogenes*, representando 14% do total. Este estudo reforçou a importância do controle e monitoramento de *L. monocytogenes* no ambiente e equipamentos de matadouros de suínos.

Palavras-chave: *Listeria* sp., abate de suínos, PCR.

1.Introdução

Listeria monocytogenes é um micro-organismo que está vastamente propagado no ambiente, podendo ser encontrada na vegetação, solo, alimentos, fezes humanas e de animais, efluente de esgoto e corpos de água (VÁZQUEZ-SALINAS et al., 2001; QUINN et al., 2005).

A contaminação por este patógeno pode ser considerada um problema de saúde pública, uma vez que a doença causada no homem inclui infecções severas, como septicemias, encefalite, meningite e aborto, com altas taxas de hospitalizações e mortes. Acomete principalmente pessoas idosas, recém-

nascidos, gestantes e indivíduos imunocomprometidos (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

É capaz de se reproduzir dentro de uma ampla faixa de temperatura, que vai de 25 a 45°C. Ainda assim, desenvolve-se e multiplica-se em alimentos mantidos sob refrigeração, mesmo em câmaras frigoríficas (DYKES, 2003). Tem habilidade de tolerar repetidos congelamentos e descongelamentos sem sofrer alteração; apesar do seu pH ótimo estar entre 6 e 8, tolera condições entre 5,5 e 9,6. Na indústria da carne, embutidos e até mesmo de laticínios, este micro-organismo pode ser considerado um problema, já que sobrevive aos níveis de nitrato de sódio e de cloreto de sódio recomendados pela legislação vigente (120mg/kg de NaNO₃ e 3% de NaCl) (VARNAM, 1991; QUINN et al., 2005; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Pisos e ralos são classificados como origem primária de *L. monocytogenes* nos locais de processamento, entretanto consegue-se encontrá-la em diversos aparelhos e locais como vedações, correias transportadoras, máquinas de fatiar, cortar e embalar, contentores, facas, mesas e paredes; em muitos casos, pela dificuldade na higienização dessas partes ou equipamentos (VARNAM, 1991; MORETRO et.al., 2004). Apresenta grande habilidade de sobreviver mesmo com a aplicação dos sanitizantes recomendados pela legislação vigente, o que reforça a preocupação da indústria com este micro-organismo (VARNAM, 1991; QUINN et al., 2005; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Roça (2004), afirma que a probabilidade de contaminação da carne durante o processo de abate é alta, sua intensidade depende da eficiência das medidas higiênicas adotadas. O autor citado também evidencia a necessidade prevenir a contaminação cruzada através da realização adequada das operações unitárias, praticando procedimentos corretos e padronizados, adotando boas práticas de higiene e monitorando minuciosamente todas as etapas da cadeia produtiva.

Como alternativa à microbiologia convencional utilizada nas indústrias de alimentos, os métodos envolvendo biologia molecular vem se tornando cada

vez mais utilizados, principalmente pelo fato destes apresentarem menor custo da análise, maior sensibilidade, especificidade e rapidez (MALDONADO, 2008). Vários métodos envolvendo genes estão sendo utilizados com êxito na tipagem molecular de *L. monocytogenes* (PARISI *et al.*, 2009; DESTRO *et al.*, 2000). Chen *et al.* (2006) constataram que o ingresso de técnicas moleculares de subtipagem modificou muito o âmbito das análises microbiológicas e proporcionou o entendimento da estrutura da população de *L. monocytogenes* e o progresso de contágio deste micro-organismo. De acordo com Corcoran *et al.* (2006) este ingresso tende a ser benéfico na averiguação de ocorrências de surtos de listeriose.

Considerando os aspectos abordados, objetivou-se neste estudo analisar a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em ambiente de abatedouro-frigorífico de suínos localizado na Região dos Campos Gerais – PR, através do método de PCR.

2. Materiais e métodos

A pesquisa foi realizada em um abatedouro-frigorífico de suínos e fábrica de embutidos que atua sob o serviço de inspeção do Paraná, para produtos de origem animal SIP/POA. A empresa localizada na região dos Campos Gerais, Paraná, possui capacidade de abate média diária de 400 suínos/dia e produção diária de embutidos correspondente a 1,5 toneladas.

A amostragem ocorreu durante o primeiro turno de abate e os pontos escolhidos, tiveram como base o estudo de Schittler (2005), com adaptações quando necessárias. A Figura 1 mostra o fluxograma do sistema de produção para o abate de suínos e com locais mais susceptíveis à contaminação. Os pontos analisados assim como as áreas amostradas, foram codificadas através de números de 1 até 21, seguindo a sequência apontada no fluxograma.

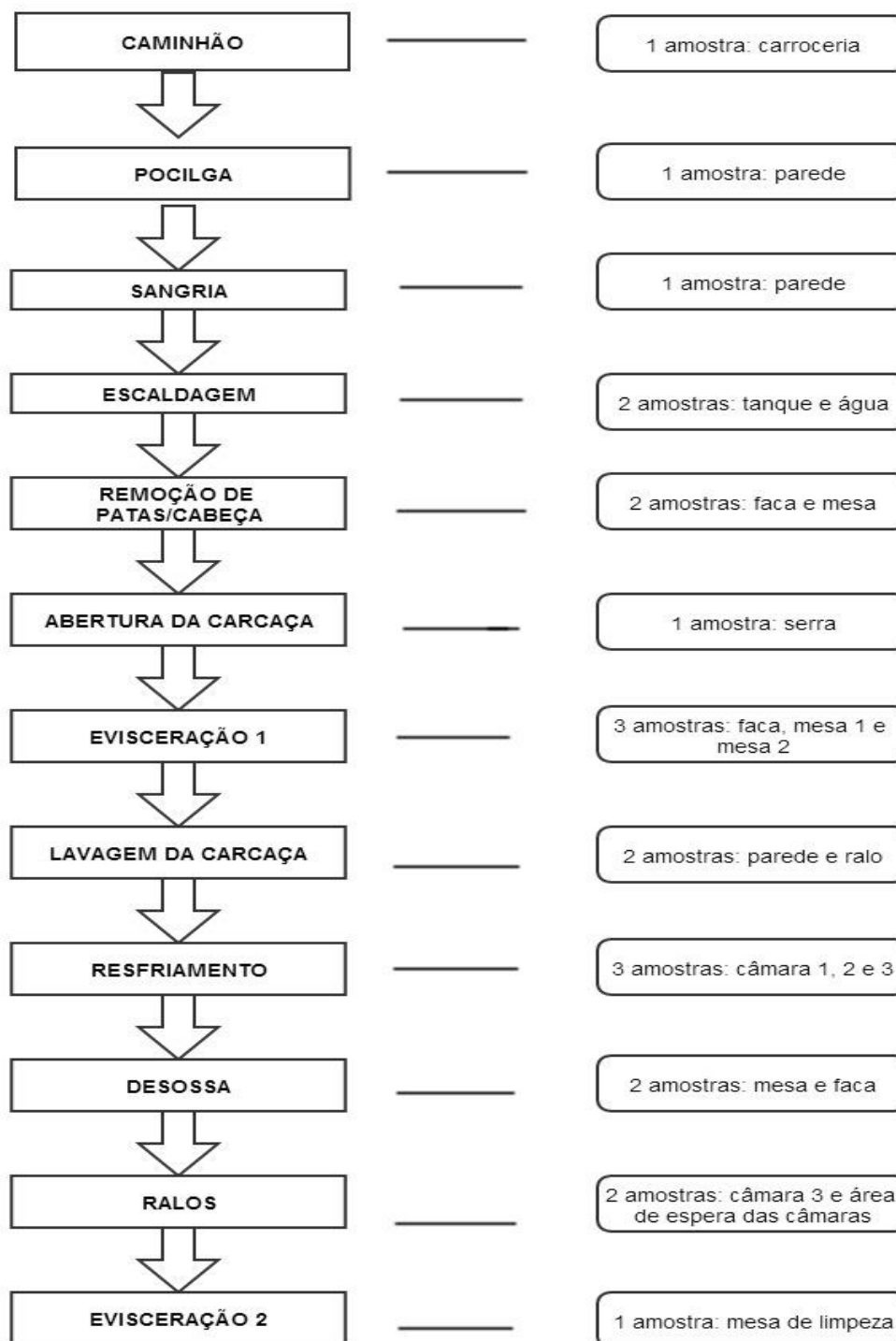


Figura 1: Sistema de abate de suínos e locais amostrados.

Fonte: Autoria Própria

As amostras foram coletadas utilizando a técnica de esfregaço de superfície (Swab), que consiste na fricção de um cotonete estéril sobre a superfície a ser analisada, no interior de um molde estéril com área de 25 cm², revertendo-se a direção entre as sucessivas passagens (ABNT, 1998; SILVA et al., 2001). Os swabs contendo as amostras foram resuspenso em 9mL de caldo BHI e mantidas sob refrigeração até o seu processamento. Após coletadas, as amostras foram levadas sob refrigeração para o Laboratório de Microbiologia da UTFPR – Campus Ponta Grossa, onde permaneceram em incubação por 24h sob temperatura de 37°C. Depois de incubadas seguiram para o Laboratório de Bioengenharia da UTFPR – Campus Ponta Grossa para realização dos testes de PCR.

A amostra de água foi coletada em frasco estéril e levado, sob refrigeração, para posterior análise de PCR no Laboratório de Bioengenharia do mesmo Campus.

Extração de Dna

Para o procedimento de extração de DNA, seguiu-se o protocolo utilizado por Peres (2007), utilizando o método de Lise Térmica, sendo que o mesmo sofreu adaptações. Transferiu-se 2 ml de uma cultura de 18 horas em caldo BHI para um microtubo estéril. Após centrifugação a 5.000 rpm durante 4 minutos, o sobrenadante foi desprezado, o pellet foi lavado três vezes com 500 µl de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,8) e submetido a uma centrifugação por dois minutos a 5.000 rpm. O pellet foi suspenso novamente em 100 µl de TE e mantido no banho seco, com temperatura de 98° por 10 minutos. Em seguida foi feita centrifugação a 12.000 g durante 30 segundos e o sobrenadante foi estocado a -20°C para posterior utilização.

Reação da PCR

Para a reação de PCR, seguiu-se o modelo descrito por Lange et. Al. (2005), e sofreu adaptações devido a marcas de reagentes e também

equipamentos. A reação denominada “mix”, continha 1 µl de cada primer (10 µM), 5 µl de tampão de PCR 10 X, 1,5 µl de MgCl₂ (50mM), 1 µl da mistura de nucleotídeos (10 mM), 0,2 U de Taq polimerase, 3µl de DNA bacteriando e água Milli-Q para completar um volume de 25 µl. As condições de amplificação foram: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos à temperatura de anelamento dos primers, que foi 50°C e 45 segundos a 72°C, e uma extensão final de 5 minutos a 72°C, como descrito por Aznar (2003). Após realizado a PCR, as amostras foram submetidas a Nested PCR, visando a exclusão de resultados falso-positivos, conforme estudo de Samulak(2013). Como controle positivo da reação, utilizou-se DNA extraído da amostra de *L. monocytogenes* ATCC 19117, e como controle negativo, água Milli-Q esterilizada. Os primers utilizados na reação são CCTAAGACGCCAATCGAA e AAGCGCTTGCAACTGCTC, referentes ao gene hlyA, amplificando 702pb, segundo referencia de Border et.al.(1990).

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose, aproximadamente uma hora utilizando-se 70 volts. O gel de agarose foi submerso em solução de brometo de etídio durante 15 minutos e fotografado solução de brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL, por 10 minutos e fotodocumentados em transiluminador ultravioleta utilizando software LpiX Image para a visualização das bandas. Utilizou-se marcador de peso molecular de 100 pb para estimativa do tamanho dos produtos de PCR. Ao final da análise, constatando-se um produto de PCR que apresente 700pb, poderá ser confirmada a presença de *L. monocytogenes*.

3.Resultados

Os resultados obtidos foram tabelados, visando uma maior compreensão e visualização do local exato da contaminação, conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Resultados demonstrando presença de *L. monocytogenes* em ambiente produtivo de Abatedouro-Frigorífico através de técnica de PCR

LOCAL AMOSTRADO	NUMERAÇÃO	PRESENÇA DE <i>L.monocytogenes</i>
Carroceria do caminhão	1	-
Paredes(Pocilga)	2	-
Parede (Sangria)	3	-
Água (Tanque de escaldagem)	4	-
Parede (tanque de escaldagem)	5	-
Mesa (Remoção das patas e cabeças)	6	-
Faca (Remoção das patas e cabeças)	7	-
Serra (Abertura da carcaça)	8	-
Faca(Evisceração 1)	9	-
Mesa 1 (Evisceração 1)	10	-
Mesa 2 (Evisceração 1)	11	-
Parede (Lavagem da carcaça)	12	-
Ralo (Lavagem da carcaça)	13	-
Parede (Câmara de Resfriamento 1)	14	-
Parede (Câmara de Resfriamento 2)	15	-
Parede (Câmara de Resfriamento 3)	16	-
Mesa (Desossa)	17	-
Faca (Desossa)	18	-
Ralo (Câmara de Resfriamento 3)	19	+
Ralo (Área de espera das Câmaras de Resfriamento)	20	+
Mesa (Evisceração 2)	21	+

Fonte: Autoria Própria

Como demonstrado na tabela anterior, das 21 amostras coletadas no estabelecimento estudado, três tiveram respostas confirmativas para *Listeria monocytogenes*, representando 14% do total, sendo uma da mesa de evisceração e duas isoladas de ralos do ambiente frigorífico.

Esses resultados sugerem que a presença de *L. monocytogenes* no ambiente industrial pode levar a contaminação de produtos em processamento. De qualquer forma, a higienização rigorosa do ambiente de abatedouros-frigoríficos deve fazer parte de medidas de controle para prevenir este micro-organismo, visando evitar os resultados positivos encontrados nesta pesquisa (NALÉRIO et. al. 2009).

Alguns patógenos, como é o caso desta em estudo, podem fixar-se no ambiente da planta de processamento e encontrar nichos onde podem sobreviver por longos períodos de tempo (ZANQUETTA et.al. 2013). Uma das hipóteses para a presença do micro-organismo nesta planta em questão, é a formação de aerossóis produzidos durante a etapa de limpeza/desinfecção, esta fase pode estar sendo realizada de forma inadequada ou ineficiente.

Caselani (2013), analisou 411 amostras de plantas processadoras de carne de frango e de carne de suínos, sendo que 62 foram positivas para *L. monocytogenes*. Essa detecção se deu durante o processamento e após a higienização, e concluíram que a presença de resíduos orgânicos, pH neutro, baixas temperaturas e alta umidade favorecem à contaminação por este micro-organismo. Este dado pode explicar os resultados confirmativos desta pesquisa, pois esta é uma condição rotineira nos setores de processamento do abatedouro, devido à presença de resíduos orgânicos, pedaços de gorduras e sangue, bem como a baixa temperatura do ambiente.

Apesar da Circular no 354/2004 do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) não estabelecer limites para as estimativas de *Listeria sp.* e *L. monocytogenes*, de acordo com a legislação, resultados positivos frequentes (mais de dois) em amostras ambientais para *L. monocytogenes*, indicam a necessidade de realização de testes no produto final para avaliar a inocuidade do mesmo (BRASIL, 2004).

Resultados positivos frequentes em amostras ambientais para *L. monocytogenes*, indicam a necessidade de realização de testes no produto final para avaliar a inocuidade do mesmo. Mesmo nos casos em que os índices não é extremamente alto, como os encontrados neste trabalho, são importantes para avaliar os programas de qualidade do local de abate e processamento, buscando a ausência de contaminação do produto final.

Von Laer (2004) ao analisar amostras coletadas em uma planta de processamento de linguiça mista frescal, localizada na cidade de Pelotas/RS, Brasil, detectou a presença de *L. monocytogenes* em 21% (4) e 20,8% (5) das 19 amostras de ambientes e 24 de equipamentos, respectivamente. Esse resultado em conjunto com o obtido neste estudo, demonstra a fragilidade da produção de embutidos quanto a presença de *L. monocytogenes*, evidenciando como é comum sua presença nesses locais.

Silveira (2010) verifica ser o piso e os ralos os importantes focos de contaminação para o produto final, uma vez que todas as amostras de piso e ralos coletadas apresentaram contaminação por *L. monocytogenes*, assemelhando-se aos resultados encontrados neste trabalho. A mesma autora cita em seus estudos que todas as amostras de ralo apresentaram colônias típicas de *Listeria* sp, evidenciando também a questão higiene como uma das principais causas de presença do patógeno no ambiente de processamento, mesmo em se tratando de pisos e ralos.

Suíños carregam a bactéria no trato gastrointestinal, como pode ser observado em estudos que amostraram fezes nas paredes do local de abate e *swabs* peri-anais de animais ao abate. A partir desses animais carreadores, as carcaças seriam contaminadas pelo extravasamento do conteúdo intestinal na linha de processamento (THEVENOT *et al.*, 2006). Esta informação pode ser confirmada, já que os pontos onde houveram confirmação de *L. monocytogenes* possuíam contato com as fezes dos animais, principalmente na mesa de evisceração, onde é realizada a higiene das tripas para posterior embutimento.

Von Laer (2006), ao analisar, através da PCR, amostras coletadas em uma planta de processamento de linguiça mista frescal, localizada na cidade de Pelotas/RS, Brasil, detectou a presença de *L. monocytogenes* em 21% (4) e 20,8% (5) das 19 amostras de ambientes e 24 de equipamentos, respectivamente. Demonstrando mais uma vez, a importância das análises rápidas no ambiente produtivo, afim de se prevenir a contaminação de *L. monocytogenes* no processamento de produtos cárneos.

De acordo com Rodrigues et al. (2011), é possível observar que o diagnóstico molecular via amplificação de DNA (PCR) está em crescimento e conseqüentemente as inovações relacionadas serão notáveis nos próximos anos, com a valorização do limiar de detecção e tempo de análise, o que é considerado uma inovação tecnológica.

Vale reforçar que a indústria deve estar atenta a esta tendência, pois pode estar elevando a credibilidade e a vantagem competitiva da empresa, pois fatores como alta confiabilidade, sensibilidade, especificidade, tempo de análise, custos, entre outros, são aspectos relevantes associados à PCR.

Por mais que *L. monocytogenes* tenha sido encontrado em locais cotidianos para sua proliferação e que a incidência tenha sido baixa no estabelecimento estudado, observa-se uma evidente preocupação com o controle de qualidade e melhoria no processo de higiene do estabelecimento, pois o mesmo agora conta com serviços de auditoria e monitoramento das condições microbiológicas em todo o processo industrial, mantidos sob inspeção do SIP/POA.

4. Conclusão

Este trabalho reforçou a importância do controle e monitoramento de *L. monocytogenes* no ambiente e equipamentos no matadouro de suínos estudado, evidenciando, neste caso, que os ralos são importantes pontos de disseminação de *L. monocytogenes* dentro do ambiente frigorífico.

A mesa de evisceração também se mostrou como possível foco de contaminação cruzada por este micro-organismo, provavelmente por contaminação com fezes. Portanto, estes pontos devem receber atenção redobrada nos processos de higienização aplicados aplicado nesta planta processadora de carne suína.

Ressalta-se ainda, a técnica de PCR como uma alternativa de extrema eficiência para detecção de patógenos em linhas de processamento de alimentos, tornando as análises mais céleres e confiáveis.

5. Agradecimentos

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

6. Referências

ABNT- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Preparo da amostra para exame microbiológico**. Rio de Janeiro: ABNT, março, 1988.

AUTIO, T., SÄTERI, T., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., RAHKIO, M., LUNDÉN, J., KORKEALA, H. *Listeria monocytogenes* contamination pattern in pig slaughterhouses. **Journal Food Protection**, v.63, n.10, p.1438-1442, 2000.

BARROS, M.A.F.; BELOTI, V.; HAGA, M.M.; CAVALETTI, L.; d'OVIDIO, L.; AMORIM, F.A.; NERO, L.A. *Listeria spp.*: ocorrência em equipamentos e ambientes de processamento de carne bovina. Semina: **Ciências Agrárias, Londrina**, v. 25, n.4, p. 341-348, 2004.

BERRANG, M.E.; MEINERSMANN, R.J.; FRANK, J.F.; SMITH, D.P.; ENZLINGER, L.L. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes*

isolated from a poultry further processing facility and from fully cooked product. **Journal of Food protection**, v. 65, nº.10, p. 1574-1579, 2002.

BORDER, P.M.; HOWARD, J.J.; PLASTOW, G.S.; SIGGENS, K.W. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v.11, p.158-162, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular no 354/2004/DCI/DIPOA. Departamento de inspeção de produtos de origem animal. **Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil**, Brasília – DF, 25 jun. 2004. p. 3, 8.

CASELANI, K. ; PRATA, L. F. ; BIZARI, P. A. ; PEREIRA, G. T. ; MARCHI, P. G. F.; PICINATO, M. A. C. . Ocorrência de *Listeria spp.* e de *Listeria monocytogenes*, em um matadouro-frigorífico de bovinos do Estado de São Paulo. **Bioscience Journal** (UFU. Impresso), v. 29, p. 956-961, 2013.

DYKES G.A: Physical and metabolic causes of sub-lethal damage in *listeria monocytogenes* after long-term chilled storage at 4°C. **Journal applied microbiology**, v.87. P. 915-922, 2003.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Micro-organismos patogênicos de importância em alimentos**. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 2008. Cap. 4, p. 33-82.

LANGE, C; PERES, ND; ARCURI, EF; *et al.* Identificação de *Listeria monocytogenes* pela reação em cadeia da polimerase. *Rev Inst Cândido Tostes*. 2005;(60):150-3.

MATOS A.V.R; NUNES, L.B.S.; VIANNA C. ; SPINA, T.L.B. ; ZUIM, C.V.; POSSEBON, F.S.; XAVIER, D.M.; FERRAZ, M.C.; PINTO, J.P.A.N. *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157, *Salmonella* spp. e micro-organismos indicadores em carcaças bovinas para exportação. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** vol.65 n.4, 2013.

MORETRO, T.; LANGSRUD, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. **Biofilms**, v. 1, n. 2, p. 107- 121, 2004.

NALÉRIO, É.S.; ARAÚJO, M.R. de; MENDONÇA,K.S.; BASSANI, M.T.; SILVA W.P. da. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 29(3): 626-630, jul.-set. 2009

PERES, N. D. **Detecção de *Listeria monocytogenes* em leite: Sensibilidade e Especificidade da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**. 2007. 43f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Família enterobacteriaceae**. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap. 18, p. 115-130.

ROÇA, R. O. **Microbiologia da carne**. Unesp, Campus de Botucatu, 2004. Disponível em: <http://www.fca.unesp.br/outros/tcarne/tecarne.htm>. Acesso em: 23.nov. 2013.

SAMULAK, RENATA LOUIZE. **Monitoramento via pcr de salmonella spp. No processamento de carne suína. 2013.** 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2013.

SANTOS, A.; LOURENÇO, D.; FERREIRA, S.; PITA, N.; CABETE, A. **Ondas de ultra-sons.** Disponível em <http://www.esac.pt/noronha/pga/0910/trabalho_mod2/Ultra_sons_PGA_turma_2.pdf>. Acesso em 28 out. 2013.

SASAHARA, K. C.; ZOTTOLA, E. A. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. **Journal of food protection**, v. 56, n.112, p.1022-1028, 1993.

SCHITTLER, L. **Caracterização molecular e sorotipificação de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* isoladas em matadouro - frigorífico de suínos da região das Missões – RS.** 2005. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos,** 1º edição – São Paulo: Livraria Varela, 2001.

SILVEIRA, J.G. **Investigação de *Listeria sp.* e micro-organismos mesófilos totais em carcaças bovinas e em ambiente industrial de abatedouro.** 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

SWAMINATHAN, B; GERNER-SMIDT, P. Forum: The epidemiology of human listeriosis. **Microbiology and Infectiology**, v.9, p.1236-43, 2007.

TAKHISTOV, P.; GEORGE, B. Early events and pattern formation in *listeria monocytogenes* biofilmes. **Biofilms**, v.1, p.351-359, 2004.

THEVENOT, D.; DERBURG, A.; VERNZOZY-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.

VARNAM, A. H. **Foodborne pathogens**. St. Louis: mosby year book, 1991. 557 p.

VÁZQUEZ-SALINAS, C.; RODAS-SUÁREZ, O.; QUIÑONES-RAMÍREZ, E. I. Occurrence of listeria species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico City. **Food microbiology**, v. 18, n. 2, p. 177-181, 2001.

VON LAER, A., **Mapeamento da contaminação por *Listeria monocytogenes* em uma planta de processamento de lingüiça mista frescal através de sorologia e PFGE**. Pelotas, 2004.79f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.