

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

FACULDADE DE NUTRIÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE NUTRIÇÃO E ALIMENTOS



Perfil genotípico de *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. isoladas da cadeia da carne de frangos

ANDREY CONRADO RÜHLING MILCZARSKI

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kelly Lameiro Rodrigues

Co-orientador: Prof^o. Dr. Eliezer Ávila Gandra

PELOTAS, 2017

Andrey Conrado Rühling Milczarski

Perfil genotípico de *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. isoladas da cadeia da carne de frangos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientador: Prof. Dra. Kelly Lameiro Rodrigues

Coorientador: Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M639p Milczarski, Andrey Conrado Rühling

Perfil genotípico de *Listeria monocytogenes* e
Pseudomonas spp. isoladas da cadeia de carne de frango /
Andrey Conrado Rühling Milczarski ; Kelly Lameiro
Rodrigues, orientadora ; Eliezer Ávila Ganda, coorientador.
— Pelotas, 2017.

69 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação
em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição,
Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Rastreabilidade. 2. Contaminantes. 3. Micro-
organismos patogênicos. 4. Pcr. 5. Rapd. I. Rodrigues, Kelly
Lameiro, orient. II. Ganda, Eliezer Ávila, coorient. III. Título.

CDD : 641.1

Andrey Conrado Rühling Milczarski

Perfil genotípico de *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. isoladas da cadeia da carne de frangos

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do título de Mestre Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa:

Banca examinadora:

- Prof. Dra. Kelly Lameiro Rodrigues (Orientadora)

Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela UFPel

- Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra (Coorientador)

Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela UFPel

- Prof. Dra. Nádia Carbonera

Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos pela FURG

- Prof. Dra. Rita de Cássia dos Santos da Conceição

Doutora em Biotecnologia pela UFPel

- Prof. Dra. Simone Pieniz

Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela UFRGS

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha
noiva Camilla, aos meus pais,
meu irmão e a família.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus e todos aqueles que torceram, rezaram ou de alguma forma contribuíram para este momento.

Agradeço em especial aos meus pais, José Carlos e Tânia, por tudo que fizeram para hoje eu ser quem sou. Pelos inúmeros sacrifícios que tiveram que fazer para me dar uma boa educação. Ao meu irmão, por conversas, brincadeiras e momentos de descontração, mesmo que as vezes tenham sido pela internet. Ao meu avô José Conrado, que com sua história de vida me inspira a ser sempre melhor, e se um dia eu for metade do que ele é, estarei muito feliz. Aos meus padrinhos, que sempre me apoiaram e torceram por mim.

A Camilla, minha “Mozi”, minha parceira, companheira, “Meu Time”, meu porto seguro, meu amor. Por me conhecer as vezes melhor do que me conheço. Por me acalmar inúmeras vezes. Por me ouvir falar sobre as minhas bactérias e explicar repetidas vezes o meu trabalho.

À minha orientadora, Kelly Lameiro, pela sua enorme paciência, dedicação, puxões de orelha quando necessários, mesmo que a distância. Mas principalmente por confiar em mim e repassar os ensinamentos transmitidos. Ao meu co-orientador Eliezer, por estar sempre disposto a ajudar no que fosse preciso.

Ao professor Augusto Schneider, Simone Pieniz e Claudio Timm por ajudarem na realização da parte pratica e tirar algumas dúvidas no longo do desenvolvimento desse trabalho.

As gurias do LIPOA, em particular a Debora, Jana, Pati, Alana, Greyce, Marcelle, pela ajuda, mates, conversas e risadas no tempo que estive no laboratório.

As colegas de turma Jéssica e Gabrielle, pela parceria no laboratório, as conversas, os mates, os brownies e lanches.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição, em especial a técnica Josi do Laboratório de microbiologia pelas conversas, aos da portaria. A todas as colegas, professores do programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos.

Aos guris do grupo “Coríntios 12”, pela ajuda, força, oração e principalmente por compreenderem a minha ausência em algumas reuniões e estarem sempre junto.

A todos vocês meu muito obrigado por tudo!

*"And be a simple kind of man
Oh, be something you love and understand
Baby, be a simple kind of man
Oh, won't you do this for me, son?
If you can?"*

Simple man - Lynyrd Skynyrd

Resumo Geral

MILCZARSKI, Andrey Conrado Rühling. **Caracterização genética de *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas* spp isoladas da cadeia da carne de frangos**. 2017. 67f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Com o aumento na busca por uma alimentação saudável, somado ao baixo custo e alto teor proteico, a carne de frango e seus derivados têm sido uma importante alternativa de consumo. Entre as bactérias que podem contaminar a carne de frango estão a *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. que pode causar a deterioração e alteração das características sensoriais e físicas do alimento. Este estudo teve como objetivo caracterizar geneticamente isolados de *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. provenientes da cadeia de carne de frangos. Foram utilizados 25 isolados de *Pseudomonas* spp. e sete isolados de *Listeria monocytogenes*, as quais foram submetidos à amplificação de DNA pelo método de RAPD-PCR, para a caracterização de perfis genéticos das amostras. Após a amplificação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose e fotografadas sob luz Ultra Violeta para comparação dos perfis obtidos. De acordo com os perfis obtidos e analisados no programa GelComparII®, foi possível determinar que os isolados de *Listeria monocytogenes* não são oriundas da planta de processamento e, que as encontradas no varejo e consumidor tinham uma similaridade superior a 60%. Com relação as *Pseudomonas* spp., os isolados foram agrupados em seis grupos, dos quais cinco, demonstravam similaridade igual ou superior a 60% entre isolados da indústria, varejo e consumidor, indicando assim que estas bactérias permaneceram durante toda a cadeia de produção e chegando ao produto final. Os resultados mostram que é necessária melhoria nos procedimentos de higienização e sanitização dos equipamentos da planta de processamento de carne de frango para evitar que a contaminação chegue ao produto final e, conseqüentemente ao consumidor.

Palavras-chave: PCR, rastreabilidade, contaminantes, micro-organismos patogênicos, RAPD.

Abstract

MILCZARSKI, Andrey Conrado Rühling. **Genetic characterization of *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas* spp isolated from the chicken meat chain.**

2017 67f. Dissertation (Master Degree in Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Searching for a healthy diet, added to the low price and high protein content, chicken meat and its products were an important alternative of consumption. Among bacteria that can contaminate chicken meat are *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas* spp. which can cause deterioration and alteration of the sensorial and physical characteristics of the food. This study aimed to characterize genetically isolated *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas* spp. from the chicken meat production chain. Were used 25 isolates of *Pseudomonas* spp. and 7 isolates of *Listeria monocytogenes*, which were subjected to DNA amplification by the RAPD-PCR method, for the characterization of genetic profiles of the samples. After the amplification, the samples were submitted to agarose gel electrophoresis and photographed under UV light to compare the obtained profiles. The dendrogram of *L. monocytogenes* demonstrated that the isolates found prior to scalding were not isolated elsewhere than in the industry. Already isolated in the retail were found in the consumer, being considered the same bacterium with a similarity of 60%. For *Pseudomonas* spp. six groups with similarity of 60% or greater were observed. In five of these groups it was possible to aggregate isolates from the industrial, retail and consumer environments, indicating that the contamination of the industrial environment remained in the samples until the end of the chain. Indicating the need for improvements in the methods of hygiene and handling along the entire chicken meat chain.

Keywords: PCR, traceability, contaminants, pathogenic microorganisms, RAPD.

Lista de Figuras

Figura 1 – Dendograma gerado após análise de RAPD de <i>Listeria monocytogenes</i> com primers UBC127.....	47
Figura 2 – Dendograma gerado após análise de RAPD de <i>Pseudomonas</i> spp com primers BOXA1R.....	52

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Origem dos isolados de *Listeria monocytogenes* e de *Pseudomonas* spp. provenientes da cadeia de carne de frango do Sul do Brasil..... 36

Tabela 1 – Origem dos isolados de *Listeria monocytogenes* e de *Pseudomonas* spp. provenientes da cadeia de carne de frango do Sul do Brasil..... 45

Lista de Abreviaturas e siglas

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

BHI – *Brain Heart Infusion*

BPF – Boas Práticas de Fabricação

DIPOA – Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA)

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

POP – Procedimentos Operacionais Padronizados

PPHO – Procedimentos Padrões de Higiene Operacional

RAPD-PCR – *Random Amplified Polymorphic Polymerase Chain Reaction*

RIISPOA – Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária da Produção de Origem Animal

SIF – Serviço de Inspeção Federal

TSA – *Trypticase Soy Agar*

TSB – *Trypticase Soy Broth*

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UPGMA – *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*

Sumário

1. Introdução Geral.....	16
1.1 Justificativa.....	17
1.2 Objetivos	18
1.2.1 Objetivo Geral	18
1.2.2 Objetivos específicos	18
1.3 Hipóteses	18
2. Revisão de Literatura	19
2.1 Controle higiênico sanitário da cadeia de carne de frangos	19
2. 2 Listeria monocytogenes.....	20
2.3 Pseudomonas spp.....	24
2.4 Random Amplified Polymorphic Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR)	26
3. Projeto de pesquisa	28
4. Relatório do Trabalho de Campo	42
5. Artigo.....	43
6. Considerações finais	60
7. Referências	61

1. Introdução Geral

A carne de frango e seus derivados são considerados de alta qualidade proteica e aliado ao baixo custo frente a carne bovina e subprodutos, fazem com que o consumo da carne de frango venha aumentando anualmente, bem como sua produção (ABPA, 2016; USDA, 2017). O Brasil ocupa a segunda colocação no ranking de produção de frangos, com uma produção de aproximadamente 13.140 milhões de toneladas em 2015, sendo que do total produzido, 67,3% corresponde ao consumo interno e o restante destinado às exportações (ABPA, 2016).

Para assegurar a qualidade do produto final, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998, estabeleceu o regulamento técnico da inspeção tecnológica e higienicossanitária de carne de aves. Essa portaria determina os parâmetros para os controles do manejo das aves dentro de uma planta de abate e para o processamento da carne de frango, sob a responsabilidade do Serviço de Inspeção Federal (SIF) (BRASIL, 1998). Além disso, existe o regulamento técnico da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos, que descreve vários fatores a serem avaliados em relação as boas práticas de fabricação (BRASIL, 2002).

Pujurra (2013) descreve em seu trabalho, que a gestão de qualidade na cadeia de produção de carne de frango é um procedimento imprescindível para se obter um produto final de qualidade. Ressalta ainda que, a implantação de planos de controle e monitoramento do processo de produção, seguindo as diretrizes da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) na indústria de alimentos, visa eliminar qualquer tipo de perigo. De acordo com Forsythe (2002) perigo é qualquer agente biológico, químico ou físico que possa colocar em risco a saúde do consumidor. Em relação ao perigo biológico refere-se a qualquer micro-organismo que possa estar presente no alimento e que pode ser responsável por casos de doenças transmitidas por alimentos. Esses podem ter origem na própria matéria-prima, nos manipuladores e no ambiente de processamento.

Dentre os principais micro-organismos contaminantes de alimentos, estão relacionados *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. - ambas consideradas ubíquas, estão presentes em todas as partes, inclusive no próprio animal (JAY, 2005; DUFOUR *et al.*, 2008; D'AMICO & DONNELLY, 2009; CALDERA *et al.*, 2016). *Listeria monocytogenes* é responsável por causar quadros de gastroenterites leves até infecções graves na corrente sanguínea e/ou sistema nervoso central, que dependendo da vulnerabilidade do indivíduo pode levar à morte (CARPENTIER & CERF, 2011; RIVOAL *et al.*, 2013). Além disso, possui a capacidade de resistir a temperaturas de refrigeração (0°C) e formar biofilmes simples ou em comunidade com outras espécies como *Pseudomonas* spp. (VAN DER VEEN & ABEE, 2011; ALAVI & HANSEN, 2013).

O gênero *Pseudomonas* spp. representa as principais bactérias deteriorantes de alimentos, principalmente os de origem animal, mesmo quando mantidos sob refrigeração, pois podem reproduzir-se em baixas temperaturas, iguais ou inferiores a 0°C por meio da formação de biofilme (CARVALHO *et al.*, 2005; JAY, 2005; KASNOWSKI *et al.*, 2010). Dessa forma, podem permanecer nos equipamentos de uma indústria de alimentos, contaminando demais alimentos ou servindo de base para o agregamento de outros tipos de micro-organismos (GIAOURUS *et al.*, 2013; CALDERA, 2016).

1.1 Justificativa

No Brasil as doenças causadas por *L. monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. são subnotificadas, impossibilitando um rastreamento da sua fonte de origem de contaminação. De acordo com a literatura, essas bactérias são capazes de formar biofilmes em comunidade e, dessa forma, permanecer em equipamentos dentro da indústria de alimentos, contaminando os produtos destinados ao consumidor. Além disso, existem poucos trabalhos no Brasil relacionando o perfil genético destas bactérias com os pontos críticos de controle da cadeia de produção de carne de frango.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Caracterizar geneticamente isolados de *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas spp.* provenientes da cadeia de carne de frangos.

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar geneticamente *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas spp.* isolados no ambiente de processamento da carne de frangos utilizando a técnica de RAPD-PCR.
- Relacionar o perfil genético dos isolados encontrados com os pontos de isolamento, por meio da comparação dos perfis genéticos gerados utilizando a técnica de RAPD-PCR.

1.3 Hipóteses

Existem etapas na cadeia da carne de frango que favorecem a disseminação de *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas spp.* no processamento, comercialização e manipulação do produto final.

Há relação entre o perfil genético dos isolados de *Listeria monocytogenes* e os pontos de isolamento onde estes foram detectados.

Há relação entre o perfil genético dos isolados de *Pseudomonas spp.* e os pontos de isolamento onde estes foram detectados.

2. Revisão de Literatura

2.1 Controle higienicossanitário da cadeia de carne de frangos

O mercado consumidor de alimentos exige critérios para que o alimento seja destinado para o consumo humano, tais como: qualidade da matéria-prima, estar livre de contaminantes, bem-estar animal, dentre outros. Assim, é preciso que o alimento seja inócuo, além de trazer benefícios nutricionais e à saúde do consumidor. Bactérias como *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. estão entre os principais causadoras de doenças transmitidas por alimentos (SOUZA *et al.*, 2014). Dessa forma, é imprescindível que a gestão de controle de qualidade nos frigoríficos avícolas seja aplicada em vários pontos da indústria, desde os cuidados com o abate até a higienização dos equipamentos utilizados durante o processamento (TOLEDO, 2001; BUENO, 2007; PUJURRA, 2013).

Dentre as várias fontes de contaminação que podem estar sujeitos os produtos de origem animal estão a microbiota do próprio animal, os equipamentos utilizados no processamento, o próprio processamento do produto, as instalações e os manipuladores. A qualidade microbiológica dos produtos de origem animal, de forma geral, é dependente da gestão de controle de qualidade que é aplicada durante toda a cadeia de produção, desde a recebimento das aves até o armazenamento e comercialização do produto final (BORGES; FREITAS, 2002; MESQUITA *et al.*, 2006).

Souza Junior (2009) descreveu os principais patógenos encontrados em carnes de frango e subprodutos, bem como os riscos que estes micro-organismos representam ao ser humano, tais como *Listeria monocytogenes*, causando a listeriose, *Pseudomonas* spp. causadora de gastroenterites e *Salmonella* spp. causadora de salmonelose.

Com o objetivo de estabelecer normas para o controle higienicossanitário da cadeia produtora de carne de frango, o MAPA, em 10 de novembro de 1998, lançou a Portaria nº 210, que tem por objetivo a padronização dos métodos de elaboração de produtos de origem animal, em todos os aspectos que envolvem

a preparação dos produtos finais. A portaria apresenta normativas para as instalações, equipamentos, higiene do ambiente, esquema de trabalho do Serviço de Inspeção federal (SIF), desde a recepção das aves até a expedição do produto final ao consumidor. A presença do SIF em um abatedouro/frigorífico de aves é condicionada pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária da Produção de Origem Animal (RIISPOA), que se encontra sob supervisão do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) (BRASIL, 1998).

No âmbito do controle microbiológico é realizada contagem global de micro-organismos sobre produtos de origem animal, presença de produtos do metabolismo bacteriano, exame bacteriológico da água que abastece os estabelecimentos de abate/industrialização, exame bacteriológico de matérias-primas e produtos afins empregados na elaboração de produtos de origem animal (BRASIL, 1998; BRASIL, 2001). Todos os padrões microbiológicos estão sujeitos a Resolução da Diretoria Colegiada nº 12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

De forma geral, as análises microbiológicas tendem a ser realizadas com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica na cadeia de processamento, principalmente nas etapas de escaldagem, evisceração, setor de congelamento, câmaras de estocagem e no produto final, propondo-se diagnosticar um possível agente causador de infecção ou toxi-infecção alimentar. E, ainda, avaliar o grau de contaminação microbiana deteriorante, obter um monitoramento dos equipamentos utilizados e, conseqüentemente, poder indicar medidas corretivas nos pontos críticos de controle (MESQUITA et al., 2006, NOGUEIRA, 2010; FREITAS, 2011; PUJURRA, 2013; ABERC, 2015).

2. 2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes vem causando problemas em animais há muitos anos. Porém, desde o início da década de 1980 a preocupação dos pesquisadores com esta bactéria aumentou. Isso ocorreu após surtos de

listeriose ligados a alimentos, que ocorreram na América do Norte e na Europa (GALVÃO *et al.*, 2012; RODRÍGUEZ-LÓPEZ *et al.*, 2015). A listeriose pode ser considerada uma grave doença de origem alimentar que causa severas infecções em humanos e tem altas taxas de mortalidade em indivíduos imunocomprometidos (HEIR *et al.*, 2004; GUDMUNDSDÓTTIR *et al.*, 2005; LAMBERTZ *et al.*, 2013).

O gênero *Listeria* é composto por *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, e *L. weihenstephanensis* (ZHANG *et al.*, 2007; HALTER, NEUHAUS & SCHERER, 2013). Dentre essas, somente *L. monocytogenes* é considerada patogênica ao homem, apesar de existirem casos relatados de infecção causados por *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. ivanovii* (CHAMBEL *et al.*, 2007).

L. monocytogenes é considerada uma bactéria ubíqua, por estar disseminada em toda a natureza sendo encontrada em esgotos, água, solos, vegetais em decomposição, silagem, fezes de várias espécies de mamíferos, aves e peixes (que em geral são portadores assintomáticos), além de uma diversidade de frutos do mar (camarões, mariscos, ostras, entre outros) (DESTRO, 1995; DAUPHIM, RAGIMBEAU & MALLE, 2001; FRYE & DONNELLY, 2005; RYSER, 2007; D'AMICO & DONNELLY, 2009). Isso explica porque é possível encontrá-la em alimentos de origem animal, frutos do mar e vegetais *in natura* ou minimamente processados.

L. monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva em forma de bastonete, não formadora de esporos e apresenta mobilidade por meio de um flagelo. Entretanto, esta mobilidade só é possível em temperaturas entre 20 e 25 °C; pois em temperaturas acima de 35 °C possui baixa mobilidade ou quase inexistente. Devido a sua natureza anaeróbica facultativa, quando cultivada em meio semisólido, apresenta locomoção e crescimento em forma de “guarda-chuva”, o que representa uma característica visível para a sua identificação (DOUMITH *et al.*, 2004).

Por apresentarem características psicrotróficas, as bactérias do gênero *Listeria* são resistentes e capazes de crescer em temperaturas de refrigeração

entre 0° a 4 °C, bem como em temperaturas de 40 °C. Além disso, podem sobreviver em condições de pH que variam de 4,2 até 9,6, embora o pH ideal para o seu crescimento seja entre 6 a 8. Outro fator importante para sua sobrevivência é a capacidade de resistir a altas concentrações de Cloreto de Sódio (NaCl) (DOUMITH *et al.*, 2004). Isso demonstra particular importância no gênero *Listeria*, em especial na espécie *L. monocytogenes*, para a indústria alimentícia (CARPENTIER & CERF, 2011), pois sobrevivendo ao ambiente industrial a bactéria pode, além de contaminar demais produtos, chegar ao consumidor final. Também pode encontrar condições favoráveis para o seu crescimento em pisos com água acumulada, fossas e interior das instalações de uma indústria de alimentos, geralmente em ambientes frios e úmidos, como câmaras frias (CARPENTIER & CERF, 2011).

As espécies de *Listeria* spp. são caracterizadas pela sorotipagem, que está baseada em 15 antígenos somáticos (“O”) e cinco flagelares (“H”), os quais determinam 17 sorovares. Neste grupo a *L. monocytogenes* está representada por 13 sorovares e alguns deles são compartilhados com *L. innocua* e *L. seeligeri*. No entanto, apenas três apresentam patogenicidade e estão ligados aos casos de listeriose, sendo estes sorovares 1/2a, 1/2b e 4b (JAY, 2005; BUCHANAN *et al.*, 2017). A estirpe 1/2a é mais frequentemente encontrada nos alimentos contaminados (DAUPHIN, RAGIMBEAU & MALLE, 2001).

Os problemas causados pela listeriose vão desde um quadro de gastroenterite leve até infecções graves na corrente sanguínea e/ou do sistema nervoso central, podendo provocar meningite, encefalite, septicemia e, dependendo da vulnerabilidade do indivíduo, a morte. Esses problemas acometem principalmente idosos, crianças, imunodeprimidos e gestantes, que podem apresentar aborto espontâneo, nascimentos prematuros ou natimortos e ainda infecções neonatais (LIU, WANG & GRIFFITHS, 2007; CARPENTIER & CERF, 2011; RIVOAL *et al.*, 2013). Pode haver duas variações do tipo de contaminação: a forma invasiva, que afeta principalmente os grupos supracitados, a variação não-invasiva auto-limitante, que causa uma gastroenterite leve e febril (LIU, WANG & GRIFFITHS, 2007; TODD e NOTERMANS, 2011).

Outra característica de *L. monocytogenes* é a sua capacidade de produzir biofilmes, que podem ser formados apenas por espécies de *Listeria* spp. ou ainda ocorrer de forma multiespécie tanto com bactérias Gram-positivas como com Gram-negativas (VAN DER VEEN & ABEE, 2011; ALAVI & HANSEN, 2013). Demoliner (2015) utilizando os mesmos isolados do presente estudo, determinou que esses são fracos formadores de biofilmes.

Dessa forma, as interações entre as espécies que formam estes complexos tende a variar com relação aos gêneros presentes e as condições ambientais (VAN DER VEEN & ABEE, 2011). Estudos envolvendo a formação de biofilme de multiespécies têm verificado que *Pseudomonas* são os colonizadores iniciais, formando uma base para instalação de outras espécies como *L. monocytogenes*, demonstrando complexidade das interações e diferentes efeitos que as demais bactérias associadas podem ter sobre *L. monocytogenes* (CARPENTIER & CHASSAING, 2004; RIEU *et al.*, 2008).

Além disso, *Listeria* spp. apresenta habilidade de sobreviver por longos períodos em condições adversas, colonizar e persistir em ambientes de processamento de alimentos, o que representa um risco para o consumidor (WAGNER *et al.*, 2006). O fato de ser encontrada em plantas de processamento de alimentos é um indicativo de que a atenção do colaborador durante o processo de sanitização dos equipamentos deve ser redobrada, já que ela possui a capacidade de formar biofilme e, assim, resistir à ação de desinfetantes (PAN, BREIDT & KATHARIOU, 2006; IBUSQUIZA, HERRERA & CABO, 2011).

No Brasil, casos de listeriose humana são subnotificados e sub diagnosticados (SILVA *et al.*, 2010), sendo que não existe nenhum caso relatado que seja de origem alimentar (BRITO *et al.*, 2008). Além disso, existe ainda pouca informação sobre a variação genética da *L. monocytogenes* isolada em ambientes industriais no Brasil (BARANCELLI *et al.*, 2014).

Em um estudo realizado na França, Rivoal *et al.* (2013) efetuaram a tipificação de *L. monocytogenes* em ambiente de preparação de ovos líquidos, onde foram analisadas 1557 amostras, sendo que destas 87 amostras foram positivas para *L. monocytogenes*. Na Suécia, Lambertz *et al.* (2013) analisaram alimentos prontos para o consumo e os ambientes de processamento,

encontrando resultados que demonstraram contaminação por *L. monocytogenes* em 73 isolados provenientes de alimentos e 62 isolados encontrados nos ambientes de processamento de alimentos. Heir *et al.* (2004) analisaram três plantas de processamento de carnes na Noruega, durante três períodos de tempo diferentes, encontrando 47 isolados no ambiente de produção e cinco isolados na carne fresca. Souza Junior (2009) realizou a avaliação microbiológica de carcaças de frango em Botucatu, SP, encontrando além de *L. monocytogenes*, bactérias do gênero *Pseudomonas* spp., entre outras bactérias psicotróficas. Galvão *et al.* (2012) realizaram a caracterização de *L. monocytogenes* em carcaças bovinas e plantas de processamento de carne. Pacheco (2014), avaliando a qualidade microbiológica de uma cadeia de carne de frangos na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil, encontrou sete isolados de *L. monocytogenes*.

2.3 *Pseudomonas* spp.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. são um grupo heterogêneo de micro-organismos da família *Pseudomonadaceae*. São bastonetes Gram-negativos, possuem mobilidade, são aeróbicos, não fermentativos, catalase e oxidase positivos, psicotróficos e não formadores de esporos (SILVA *et al.*, 2010; SCACCABAROZZI *et al.*, 2015; CALDERA *et al.*, 2016).

Por sobreviver e ter a capacidade de multiplicar-se, mesmo que lentamente, em temperaturas iguais ou inferiores a 0° C, sendo a temperatura ótima de 15 a 30° C, são responsáveis pela contaminação e deterioração de alimentos refrigerados, principalmente de origem animal, devido a produção de lipases e proteases resistentes tanto em baixas temperaturas como em mais elevadas (DUFOUR *et al.*, 2008; CALDERA *et al.*, 2016).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. são diversas e ecologicamente significativas, pois são encontradas em diversos ambientes (DUFOUR *et al.*, 2008). A sua larga distribuição em ambiente natural ou industrial ocorre devido a sua capacidade de adaptação ao meio e as várias condições,

utilizando-se muitas vezes da formação de biofilmes em comunidade com outras bactérias, como *L. monocytogenes* (GIAOURUS *et al.*, 2013), e por degradar uma ampla gama de substratos devido ao seu sistema enzimático complexo (DUFOUR *et al.*, 2008; CALDERA *et al.*, 2016).

Algumas espécies são agentes contaminantes de plantas e animais. Outras são agentes patógenos para seres humanos, geradores de doenças brandas como simples diarreias e gastroenterites, transmitidas por alimentos. Ou ainda, existem casos mais graves, como infecções oportunistas em imunodeprimidos (MARCHAND *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010).

Micro-organismos do gênero *Pseudomonas* spp. são os principais responsáveis pelas alterações das carnes refrigeradas e conservadas em condições de aerobiose. Em alimentos com alta atividade de água mantidos em temperatura de refrigeração, estas bactérias são responsáveis por causar alteração físico-químicas e até mesmo sensoriais no produto (JAY, 2005).

O crescimento de *Pseudomonas* spp. na carne é acompanhado de intensa atividade proteolítica, resultando em acréscimo do nível de nitrogênio não proteico, principalmente sob a forma de peptídeos e amônia. A amônia apresenta toxicidade ao homem e sua formação durante o processo de deterioração da carne está relacionada aos processos enzimáticos (ANTUNEZ *et al.*, 2006).

Caldera *et al.* (2016) analisaram diferentes alimentos como produtos cárneos, vegetais pronto para o consumo, leite e queijo, e encontraram 66 isolados de *Pseudomonas* spp. Voloski (2014) analisando a qualidade microbiológica do processamento de cortes de carne de bubalinos, encontrou 2,9 log UFC.g⁻¹ na superfície de produção e 3,0 log UFC.g⁻¹ nos cortes cárneos de bubalinos. Pacheco (2014) analisando a cadeia de produção de carne de frango, encontrou 25 cepas de *Pseudomonas* spp.

Dentre as principais espécies de *Pseudomonas* deteriorantes de alimentos estão: *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. fragi*, *P. melfítica*, *P. synxantha*, *P. mucidolens*, *P. taetrolens*. (GALARZ, FONSECA & PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2010; ALCANTARA *et al.*, 2012; CALDERA *et al.*, 2016)

2.4 Random Amplified Polymorphic Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR)

As técnicas tradicionais de análise microbiológica de alimentos fundamentam-se na utilização de testes morfológicos e bioquímicos para tipagem, subtipagem e identificação de gêneros, espécies e subespécies microbianas. As técnicas microbiológicas mais comumente utilizadas são realizadas em meios de cultura não-seletivos e seletivos complementadas por testes bioquímicos diferenciais, na sua maioria, de produção enzimática, usados em conjunto com testes sorológicos (GANDRA *et al.*, 2008; JADHAV, BHAVE & PALOMBO, 2012).

Porém, nas últimas décadas foram desenvolvidas técnicas moleculares para a detecção, identificação e caracterização de bactérias deteriorantes e patogênicas em alimentos. As técnicas podem ser divididas em dois tipos de utilização: voltadas para a caracterização do DNA cromossômico, plasmidial ou total de um micro-organismo, características estas relativamente estáveis (DESTRO, 1995; CHEN *et al.*, 2014), ou voltadas para aplicação direta na detecção e caracterização de bactérias em alimentos.

Dentre as técnicas moleculares que mais avançaram e subsequentemente ganharam mais destaque são as que se baseiam na amplificação de sequências do DNA pela reação da cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) (BOER & BEUMER, 1999; MALORNY *et al.*, 2003).

PCR é uma técnica com uma sensibilidade elevada, na qual pequenos fragmentos de sequências específicas de DNA, são amplificadas até que sejam obtidas milhões de cópias da sequência do DNA em estudo, por meio da ação de enzima *Taq* DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores, denominados *primers* (KONEMAN, ALLEN & JANDA, 2008). Nas últimas décadas pesquisadores tem sugerido e descrito a utilização de técnicas oriundas do PCR na detecção direta de micro-organismos contaminantes de alimentos (GANDRA *et al.*, 2008; SAIYUDTHONG & TREVANICH, 2013). Atualmente existem diversas variações do PCR tradicional, tais como *Random Amplified Polymorphic Polymerase Chain Reaction* (RADP-PCR), *Reverse Transcriptase Polymerase*

Chain Reaction (RT-PCR), *Nested Polymerase Chain Reaction*, *Multiplex Polymerase Chain Reaction*, *Polymerase Chain Reaction* em tempo real, *Restriction Fragment Length Polymorphism Polymerase Chain Reaction* (RFLP-PCR), *Repetitive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction* (REP-PCR), *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction* (ERIC-PCR), e sequências repetitivas conservadas denominadas simplesmente de BOX, REP e ERIC-PCR (GANDRA *et al.*, 2008).

Dentre as técnicas apresentadas, o RAPD-PCR foi descrito originalmente por Welsh & McClelland (1990). A técnica envolve o uso de um *primer* único e pequeno, entre 10 e 15 bases, escolhido aleatoriamente não sendo necessário um conhecimento anterior da região de ligação do *primer*, para a amplificação do DNA genômico em condições de baixa concentração. Quando aplicados no PCR, estes *primers* aleatórios irão resultar na amplificação de várias sequências de DNA, gerando assim conjuntos de fragmentos que irão atuar como marcadores genéticos. A determinação da tipagem de um isolado bacteriano será determinada pela quantidade e tamanho dos fragmentos formados durante a amplificação (DESTRO, 1995).

Quando comparado ao PCR tradicional, o RAPD apresenta como principal vantagem a possibilidade de detectar polimorfismo na cadeia de DNA, sem que haja necessidade de conhecimento anterior da sequência de nucleotídeos de um determinado gene ou do DNA alvo. O RAPD-PCR é uma técnica adequada para monitorizar estirpes em grande escala e para a comparação de toda a diversidade do genoma (ZEINALI *et al.*, 2015). Diversos trabalhos têm utilizado RAPD-PCR para identificação de *Listeria monocytogenes* e bactérias psicrótróficas, como *Pseudomonas* spp. Zeinali *et al.* (2015), analisando carcaças de frango; Keeratipibul & Techaruwichit (2012) analisando uma fábrica de carne de frango cozido; Lee *et al.* (2011) em diferentes tipos de alimentos; Ferreira *et al.* (2011) avaliando instalações de produção de salsicha fermentada; Barbosa *et al.* (2015) analisando salames; Saiyudthong e Trevanich (2013) analisando produtos de frango; Rubio *et al.* (2013) analisando salsichas fermentados em baixa acidez; Ercolini *et al.* (2009) analisando leite bovino cru; e Chen *et al.* (2014) analisando alimentos pronto para o consumo.

3. Projeto de pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

FACULDADE DE NUTRIÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE NUTRIÇÃO E ALIMENTOS



Caracterização genética de *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas* spp
isoladas da cadeia da carne de frangos

ANDREY CONRADO RÜHLING MILCZARSKI

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kelly Lameiro Rodrigues

Co-orientador: Prof^o. Dr. Eliezer Ávila Gandra

PELOTAS, 2016

Banca Examinadora:

Profª Drª Kelly Lameiro Rodrigues

(Universidade Federal de Pelotas – UFPel) - Orientadora

Profº Dr. Eliézer Avila Gandra

(Universidade Federal de Pelotas – UFPel) – Co-orientador

Profª Drª Jozi Fagundes de Mello

(Universidade Federal de Pelotas – UFPel) – Titular

Profª Drª Ângela Nunes Moreira

(Universidade Federal de Pelotas – UFPel) – Suplente

Sumário

1.Introdução.....	31
2.Objetivos.....	34
2.1.Objetivo Geral.....	34
2.2.Objetivos Específicos.....	34
3.Hipoteses.....	35
4.Metodologia.....	36
4.1.Isolados.....	36
4.2.Extração do DNA.....	37
4.3.RAPD-PCR.....	37
4.4.Aspectos éticos.....	38
4.5.Analise estatística.....	38
5.Orçamento.....	39
6.Cronograma.....	40

RESUMO

Com o aumento na busca por uma alimentação saudável, somado ao baixo custo e alto teor proteico, a carne de frango e seus subprodutos têm sido uma importante alternativa de consumo. Entre os micro-organismos que podem contaminar a carne de frango estão *Listeria monocytogenes* que causa a listeriose, doença grave que afeta humanos e *Pseudomonas* spp. que causa a deterioração e alteração das características sensoriais e físicas do alimento. *Random Amplified Polymorphic Deoxyribonucleic Acid* (RAPD) é uma técnica de biologia molecular que utiliza *primers* mais curtos e de sequência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio de sequência, baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*), e funciona como um método eficaz e relativamente de custo mais baixo de caracterização de marcadores moleculares, sendo amplamente utilizados em estudos genéticos. Este estudo tem o objetivo de caracterizar geneticamente isolados de *L. monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. provenientes da cadeia de carne de frangos. Serão utilizados 25 isolados de *Pseudomonas* spp. e sete isolados de *L. monocytogenes*, os quais foram obtidos em estudo anterior, envolvendo isolamentos bacterianos na cadeia de carne de frango. Os isolados serão submetidos à amplificação de DNA pelo método de RAPD-PCR, para a caracterização de perfis genéticos das amostras. Após a amplificação as amostras serão submetidas a eletroforese em gel de agarose que posteriormente serão fotografados em sob luz Ultra Violeta, sendo o resultado analisados por comparação dos perfis obtidos.

Palavras chave: PCR, rastreabilidade, contaminantes, micro-organismos patogênicos, RAPD.

1. Introdução

Na busca por uma melhor qualidade em termos de alimentação e da mesma forma, motivado pelo baixo custo, houve um aumento no consumo de carnes de aves, em especial a carne de frango. Neste contexto, o Brasil ocupa o segundo lugar na produção de frango com 13,140 milhões de toneladas produzidas em 2015, de acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), ficando à frente da China e atrás dos Estados Unidos. A carne de frango e seus subprodutos apresentam alta qualidade proteica, sendo uma alternativa de consumo como fonte de aminoácidos essenciais por ser uma proteína de alto valor biológico (ABPA, 2016).

Os alimentos podem ser contaminados por micro-organismos durante a sua manipulação e processamento, servindo de meio para o crescimento e proliferação dos mesmos. Desta forma, podem alterar as características físico-químicas dos alimentos que quando consumidos, originar casos de intoxicação ou infecção de origem alimentar (LAMBERTZ *et al.*, 2013).

Um dos micro-organismos que pode contaminar os alimentos, principalmente os de origem animal, é *L. monocytogenes*. Esta bactéria esteve relacionada a surtos de listeriose em diversos relatos nos Estados Unidos e na União Europeia ao longo das últimas décadas (GUDMUNDSDÓTTIR *et al.*, 2005; CARPENTIER & CERF, 2011; LAMBERTZ *et al.*, 2013). Os problemas causados vão desde um quadro de gastroenterite leve até infecções graves na corrente sanguínea e/ou no sistema nervoso central (JAY, 2005). Além disso, ressalta-se a possibilidade de *L. monocytogenes* sobreviver a baixas temperaturas, além de algumas cepas serem produtoras de biofilmes, o que aumenta a sua resistência em relação a sua remoção de equipamentos e utensílios utilizados no processamento de alimentos (WILKS, MICHELS & KEEVIL, 2006). Portanto, a presença de bactérias da espécie *L. monocytogenes* na cadeia de carne de frango representa um risco a saúde do consumidor.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. tem por característica, liberar enzimas proteolíticas e lipolíticas e formar biofilmes, causando desta forma a deterioração dos alimentos (KASNOWSKI *et al.*, 2010). *Pseudomonas* spp. predominam em carcaças e cortes refrigerados e podem multiplicar-se, mesmo

que lentamente, em temperaturas iguais ou inferiores a 0 °C. Este gênero de bactéria é responsável por grande parte das alterações físico-químicas dos produtos, principalmente os de origem animal. Isso faz com que a vida comercial destes produtos dependa tanto do tipo de conservação, quanto do número de micro-organismos presentes no produto no momento da sua aquisição pelo consumidor (CARVALHO *et al.*, 2005; JAY, 2005).

A garantia de produtos seguros do ponto de vista higiênicosanitário têm sido fundamentais para as indústrias e as autoridades competentes de fiscalização (MATHEUS, RUDGE & GOMES, 2003). De acordo com Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) os estabelecimentos produtores e/ou industrializadores de alimentos devem seguir um controle minucioso sobre o processo de abate/processamento de frangos e subprodutos para atender as exigências de segurança dos alimentos, baseado nos princípios de Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimentos Operacionais Padronizados (POP), Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (BRASIL, 2002).

Com a intenção de estudar a contaminação por bactérias como *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. em plantas de processamento de alimentos e identificar a origem da contaminação tem-se utilizado técnicas de biologia molecular (GUDMUNDSDÓTTIR *et al.*, 2005; LOMONACO *et al.*, 2011; GALVÃO *et al.*, 2012; LAMBERTZ *et al.*, 2013; BARANCELLI *et al.*, 2014). Essas representam uma geração de técnicas mais precisas e rápidas, baseando-se nas informações contidas no material genético da bactéria e sendo utilizadas tanto para a detecção como para a tipagem (DESTRO, 1995). Além disto, algumas destas técnicas, como RAPD-PCR podem ser utilizadas em estudos relacionados a rastreabilidade na cadeia de produção alimentícia, o que aumenta a eficiência dos programas de controle de qualidade. Alguns critérios são utilizados para determinar se um método de tipagem é válido para a finalidade, tais como: poder discriminatório, reprodutibilidade, facilidade na realização, interpretação e tipabilidade.

Poucos estudos epidemiológicos têm sido realizados no Brasil a fim de avaliar a diversidade genética de *Pseudomonas* spp e *L. monocytogenes*

isoladas de alimentos em conjunto. A técnica de *Random Amplified Polymorphic* tem sido mais utilizada por vários fatores, tais como o baixo custo dos reagentes utilizados em relação aos utilizados na técnica padrão ouro, manter um alto poder de repetibilidade, utilizar *primers* simples e menores de sequencias arbitrárias (JADHAV, BHAVE & PALOMBO, 2012).

2. Objetivos

2.1. Geral

Caracterizar fenotipicamente e geneticamente isolados de *L. monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. provenientes da cadeia de carne de frangos.

2.2. Específicos

- Caracterizar geneticamente *L. monocytogenes* e *Pseudomonas* spp isolados no ambiente de processamento da carne de frangos utilizando a técnica de RAPD-PCR.
- Relacionar o perfil genético dos isolados encontrados com os pontos de isolamento, através da comparação dos perfis genéticos gerados utilizando a técnica de RAPD-PCR.

3. Hipóteses

Existem etapas na cadeia da carne de frango que favorecem a disseminação de *L. monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. no processamento, comercialização e manipulação do produto final.

Há relação entre o perfil genético dos isolados de *L. monocytogenes* e os pontos de isolamento onde estes foram detectados.

Há relação entre o perfil genético dos isolados de *Pseudomonas* spp. e os pontos de isolamento onde estes foram detectados.

4. Metodologia

4.1 Isolados

Serão utilizados no estudo isolados de *Pseudomonas* spp e *Listeria monocytogenes* pertencentes a coleção em estoque conservado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, provenientes da cadeia da carne de frango (Tabela 1) sendo 25 de *Pseudomonas* spp. e sete de *Listeria monocytogenes*.

Tabela 1. Origem dos isolados de *Listeria monocytogenes* e de *Pseudomonas* spp provenientes da cadeia de carnes de frango do sul do Brasil.

Isolados (n)	Origem
<i>Listeria monocytogenes</i> (2)	Corte de frango do consumidor
<i>Listeria monocytogenes</i> (2)	Corte de frango do varejo
<i>Listeria monocytogenes</i> (3)	Carcaça de frango no processamento (Antes da Escaldagem)
<i>Pseudomonas</i> spp. (7)	Corte de frango do consumidor
<i>Pseudomonas</i> spp. (5)	Corte de frango do varejo
<i>Pseudomonas</i> spp. (13)	Carcaça de frango no processamento (5 antes da escaldagem, 4 antes do chiler, 4 pós chiler)

Fonte: o Autor, 2016.

Primeiramente, culturas congeladas em microtubos (tipo *Eppendorf*) contendo *Brain Heart Infusion* (BHI) e glicerol serão reativadas. As bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* spp serão transferidas com o auxílio de uma alça de platina para tubos de ensaio contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) estéril, e as *Listeria monocytogenes* serão transferidos para tubos contendo caldo *Trypticase Soy Broth* (TSB) com extrato de levedura (0,6%). Na sequência estes tubos serão incubados em estufa durante 24 horas a 35 °C. Após a incubação, para purificação e isolamento de colônias uma alçada de cada tubo será transferida e estriada em placas de meios específicos para cada

bactéria, para *Pseudomonas* spp, placas com meio *Trypticase Soy Agar* (TSA), e para *Listeria monocytogenes*, placas com meio ágar Palcam. As placas serão incubadas por 24/48 horas a 35 °C. Para que ocorra o isolamento, a partir das colônias que se desenvolverem nos ágares separadamente para cada bactéria será extraída uma alçada e transferida para um tubo inclinado com ágar *Trypticase Soy Agar* (TSA), que será uma cultura estoque que será utilizado sempre que se precisar utilizar novamente alguma das bactérias reativadas.

4.2 Extração do DNA

A extração do DNA será realizada com todas as culturas reativadas por meio protocolo de extração de DNA pelo Kit de Extração de DNA Mini Spin da marca Kasvi®, seguindo os procedimentos descritos pelo fabricante.

4.3 RAPD –PCR

Após a extração o DNA genômico será submetido a reação RAPD-PCR utilizando o *primer* OPA14 5'-TGT-GTG-CTG-G-3' (LEE *et al.*, 2011) para os isolados de *L. monocytogenes* e o *primer* BOXA1R 5'-CTA-CGG-CAA-GGC-GAC-GCT-GAC-G-3' (CALDERA, *et al.* 2016) para os isolados de *Pseudomonas* spp. Em ambas reações a amplificação será realizada em um termociclador modelo B960 *Heal Force*®, utilizando um volume total de reação de 20 µL, composta por 10 µL de conjunto para GoTaq® Green MasterMix (2x Tampão de reação, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP e 3 mM MgCl₂), 1 µL de *primer*, 4 µL de DNA molde e 5 µL de água ultra pura. Será utilizado o mesmo volume (4 µl) de água deionizada para substituir o DNA bacteriano como controle negativo.

As condições de amplificação realizadas durante o RAPD-PCR das bactérias *L. monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. serão: um ciclo 94 °C por 4 minutos, 45 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 36 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos e uma extensão final de 72 °C por 4 minutos para *L. monocytogenes* e um ciclo 95 °C por 7 minutos, 45 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 53 °C por 1 minuto, 65 °C por 8 minutos e uma extensão final de 65 °C por 16 minutos para *Pseudomonas* spp.

Os produtos amplificados pelo RAPD-PCR serão analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,5% para *Listeria monocytogenes* e 1% para *Pseudomonas* spp. Serão aplicados em gel de agarose 10 µL microlitros do resultado da amplificação de cada amostra. A eletroforese será realizada em tampão TAE 1X (tampão Trisacetato 40 mM contendo EDTA 1 mM, pH 8) a uma tensão constante de 50 Voltz durante 1,5 hora. O gel de agarose será corado em solução de brometo de etídio a 10 mg/mL e visualizado com transiluminador sob luz Ultra Violeta. Será utilizado como marcador de peso molecular DNA lambda 100 pb.

4.4 Aspectos éticos

É compromisso dos pesquisadores envolvidos a total preservação da identificação dos locais de coleta das amostras. O projeto não envolve experimentação em animais ou em humanos. Além disso, não será realizada aplicação de questionários e/ou entrevistas nos estabelecimentos.

4.5 Análise estatística

As análises estatísticas serão realizadas utilizando-se o programa GelComperII (versão 6.6, Applied Maths Inc., Sint-Martns-Latem, Belgium). A similaridade será calculada pela correlação de *Person's* e para aglomeração e construção do dendograma será usado o algoritmo *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages* (UPGMA).

5.Orçamento

 Materiais	Valor total (R\$)
Meios de cultura para isolamento das bactérias	2.350,00
Plásticos (ependorfs, ponteiras, placas de Petri)	900,00
Material para eletroforese	2.500,00
Marcador Lambda	290,00
Tris-Borate-EDTA	191,00
<i>Primers</i>	108,50
GoTaq® Green Master Mix	2,988.00
Total	9.327,50

* Fonte dos recursos: PROAP/PPGNA e recursos de projeto com financiamento do orientador.

6. Cronograma

	2015				2016								2017									
	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Elaboração do projeto	X	X	X	X	X	X	X	X														
Qualificação									X													
Reativação das amostras										X	X											
Análise RAPD-PCR												X	X	X	X	X	X	X				
Análise dos dados																X	X	X	X	X		
Análise estatística																X	X	X	X	X		
Redação da dissertação																	X	X	X	X	X	X
Redação de Artigo																		X	X	X	X	X
Defesa																						X

4. Relatório do Trabalho de Campo

A extração do DNA molecular das bactérias foi realizada no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA). As análises de RAPD-PCR foram realizadas duas vezes por semana, utilizando PCRMasterMix, os *primers* para cada bactéria e água ultrapura, com alterações no programa de amplificação. Durante cinco meses foram feitas diversas alterações no programa de amplificação visando alcançar o resultado esperado.

As alterações não foram eficientes e optou-se pela troca de equipamento. As análises começaram a ser realizadas no Laboratório de NutriGenômica da Faculdade de Nutrição, com auxílio do Prof. Dr. Augusto Schneider. Com a utilização de GoTaq® Green MasterMix e uma nova alteração do programa de amplificação foi possível obter os resultados esperados.

5. Artigo

Artigo a ser submetido ao periódico **Revista de Nutrição**

Caracterização genética de *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas* spp isoladas da cadeia da carne de frangos

ANDREY CONRADO RÜHLING MILCZARSKI¹, DÉBORA RODRIGUES SILVEIRA¹, Dr. AUGUSTO SCHNEIDER³, Dr. ELIEZER ÁVILA GANDRA³, Dra. KELLY LAMEIRO RODRIGUES³

¹Pós-graduando no Programa de Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição Campus Porto, Rua Gomes Carneiro, 1 – Sala 222, CEP 96010-610, Pelotas/RS, Brasil.

Andrey Conrado Rühling Milczarski: (53) 981-397-881, andreybio@gmail.com, orcid.org/0000-0001-5688-1159

Débora Rodrigues Silveira: (53) 981-264-321, debora.rsilveira@hotmail.com

Dr. Augusto Schneider: (53) 991-450-808, augustoschneider@gmail.com

Dr. Eliezer Ávila Gandra: (53) 984-139-523, gandraea@hotmail.com

Dra. Kelly Lameiro Rodrigues: (53) 991-489-826, lameiro_78@hotmail.com

Andrey Conrado Rühling Milczarski: concepção e desenho, análise e interpretação dos dados, revisão e aprovação da versão final do artigo. Débora Rodrigues Silveira e Dr. Augusto Schneider: concepção e desenho análise dos dados. Dr. Eliezer Ávila Gandra e Dra Kelly Lameiro Rodrigues: concepção e desenho, interpretação dos dados, revisão e aprovação da versão final do artigo.

O presente artigo é oriundo de Dissertação intitulada “Perfil genotípico de *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. isoladas da cadeia de carne de frangos”, de Andrey Conrado Rühling Milczarski, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas no ano de 2017.

Categoria do artigo: Original

Área temática: Alimentos

Quantidade total de ilustrações: uma tabela, duas figuras

Quantidade total de palavras: 3970

Resumo

Isolados de *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. provenientes de uma cadeia de carne de frango da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil, foram analisados quanto a sua similaridade genética. Utilizou-se a técnica de RAPD-PCR, com os *primes* UBC127 e BOXA1R, respectivamente para ambas bactérias. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese com gel de 0,5% de agarose para *L. monocytogenes* e 1% para *Pseudomonas* spp. Após a eletroforese, os perfis de fragmentos amplificados foram analisados com auxílio do programa GelComparII® com aglomeração pelo algoritmo UPGMA. O dendograma de *L. monocytogenes* demonstrou que os isolados encontrados antes da escaldagem não foram obtidos em nenhum outro ponto além da indústria. Já os isolados encontrados no varejo também foram encontrados nos produtos vendidos ao consumidor, sendo consideradas as mesmas bactérias com similaridade de 60%. Para *Pseudomonas* spp. foram observados seis grupos com similaridade igual ou superior a 60%. Em cinco destes grupos foi possível agregar isolados do ambiente industrial, varejo e consumidor, indicando que a contaminação do ambiente industrial permaneceu nas amostras até o final da cadeia. Assim, indica-se a necessidade de melhorias nos métodos de higienização e manipulação ao longo de toda cadeia da carne de frango.

Palavras chave: *Listeria monocytogenes*, carne de frango, qualidade sanitária.

Abstract

Isolates of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas* spp. from a chain of chicken meat from Southern region of Rio Grande do Sul, Brazil, were analyzed for their genetic similarity. The RAPD-PCR technique was used, with *primes* UBC127 and BOXA1R, respectively for both bacteria. The PCR products were electrophoresed with 0.5% agarose gel for *L. monocytogenes* and 1% for *Pseudomonas* spp. After electrophoresis, the amplified fragment profiles were analyzed using the GelComparII® program with agglomeration by the UPGMA algorithm. The dendogram of *L. monocytogenes* showed that the isolates found before scalding were not obtained elsewhere than in industry. The isolates found

in retail were also found in products sold to the consumer, being considered the same bacteria with similarity of 60%. For *Pseudomonas* spp. six groups with similarity equal or superior to 60% were observed. In five of these groups it was possible to aggregate isolates from the industrial, retail and consumer environments, indicating that the contamination of the industrial environment remained in the samples until the end of the chain. Thus, it is indicated the need for improvements in the methods of hygiene and handling throughout the chain of chicken meat.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, chicken meat, sanitary quality.

1. Introdução

Alguns micro-organismos psicrotróficos são considerados um problema para as indústrias de alimentos, principalmente os de origem animal, a décadas, devido ao carácter deteriorativo ou patogênico, sendo capazes de sobreviver e se multiplicar no ambiente industrial ([1], [2], [3], [4]).

L. monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva, isolada em diversos alimentos e plantas de processamento de alimentos ([2], [5]). Além disso, esta bactéria possui capacidade de sobreviver e multiplicar-se em baixas temperaturas, bem como tolerar amplas variações de pH e sal ([2], [6]). Em seres humanos chega a causar listeriose, em que os sintomas vão desde um quadro de gastroenterite leve até infecções graves na corrente sanguínea e/ou do sistema nervoso central, podendo provocar meningite, encefalite, septicemia e, dependendo da vulnerabilidade do indivíduo, a morte. Esses problemas acometem principalmente idosos, crianças, imunodeprimidos e gestantes, que podem apresentar aborto espontâneo, nascimentos prematuros ou natimortos e ainda infecções neonatais ([2], [7], [8], [9], [10], [11]). As bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. são um grupo bem heterogêneo de micro-organismos da família *Pseudomonadaceae*. São Gram-negativas, psicrotróficas e um dos principais responsáveis pela contaminação e deterioração de produtos de origem animal ([12], [13], [14], [15]). Algumas cepas são agentes patogênicos para seres humanos, geradores de doenças brandas como simples diarreias e

gastroenterites, transmitidas por alimentos. Ou ainda, existem casos mais graves, como infecções oportunistas em imunodeprimidos ([13], [16]).

Pseudomonas spp. e *L. monocytogenes* são encontradas em todos os ambientes da natureza, sendo desta forma consideradas bactérias ubíquas ([2], [15], [17]). Algumas cepas são capazes de formar biofilme, o que pode aumentar a sua adesão, resistência e conseqüentemente, a sua permanência nos equipamentos dentro da indústria de alimentos, podendo causar contaminação cruzada. Ambas as bactérias podem ser encontradas em carnes de frango, seja por contaminação natural da matéria-prima ou por contaminarem o produto em algum ponto da cadeia de produção ([2], [8]; [15], [18]).

Em investigações relacionadas ao rastreamento de pontos de contaminação, aplicações de técnicas de tipagem molecular são importantes para verificar surtos e associações epidemiológicas. Também se faz necessária a identificação da espécie ou do gênero bacteriano quando são investigadas as rotas de contaminação e a ocorrência de bactérias em plantas de processamento de alimentos. Além disso, as técnicas de tipagem molecular são mais vantajosas frente às técnicas fenotípicas, pois essas últimas têm baixo poder discriminatório em determinadas estirpes e não são aplicadas a todas as linhagens ([19], [20]).

Ao longo dos últimos anos, métodos moleculares como o *Random Amplified Polymorphic Deoxyribonucleic* (RAPD) têm sido utilizados como uma ferramenta para o rastreamento das fontes de contaminação de alimentos, bem como para monitoramento de efetividade de protocolos de boas práticas de fabricação. RAPD, é uma técnica de baixo custo, quando comparada à outras técnicas moleculares como *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), técnica considerada como “padrão ouro”, tem uma elevada taxa de discriminação, sendo uma técnica adequada para comparar a diversidade genética entre micro-organismos ([3], [11], [18], [21]; [22], [23], [24]). Tipificar micro-organismos é muito importante para identificar as fontes de contaminação ou para determinar se um processo de higienização dentro de uma planta de processamento de alimentos está sendo aplicada corretamente ([18], [19], [24]).

Este estudo teve o objetivo de caracterizar geneticamente *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. isoladas de uma cadeia de carne de frango na região sul do Rio Grande do Sul, utilizando a técnica de RAPD-PCR.

2. Material e Métodos

2.1 Isolados

Um mesmo lote de carcaça e cortes de frango foi acompanhado ao longo da cadeia da carne de frango e amostras deste lote foram analisadas em diferentes pontos desta cadeia, para o isolamento de microrganismos (dados ainda não publicados). Na Tabela 1 é possível visualizar os isolados provenientes de diferentes pontos de uma cadeia de carne de frango, na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil.

Tabela 1 Origem dos isolados de *Pseudomonas* spp. e de *Listeria monocytogenes* provenientes da cadeia de carnes de frango do sul do Brasil.

Isolados (n)	Origem
<i>Listeria monocytogenes</i> (3)	Carcaça de frango no processamento antes da escaldagem
<i>Listeria monocytogenes</i> (2)	Corte de frango do varejo
<i>Listeria monocytogenes</i> (2)	Corte de frango do consumidor
<i>Pseudomonas</i> spp. (5)	Carcaça de frango no processamento antes da escaldagem
<i>Pseudomonas</i> spp. (4)	Carcaça de frango no processamento antes do chiler
<i>Pseudomonas</i> spp. (4)	Carcaça de frango no processamento pós-chiler
<i>Pseudomonas</i> spp. (5)	Corte de frango do varejo
<i>Pseudomonas</i> spp. (7)	Corte de frango do consumidor

2.2 Reativação dos micro-organismos

As culturas foram reativadas em tubos contendo os caldos *Brain Heart Infusion* (BHI) para *Pseudomonas* spp. e *Trypticase Soy Broth* (TSB) com 0,6%

de extrato de levedura para *L. monocytogenes*, as quais foram incubadas por 24 horas a uma temperatura de 37 °C. Na sequência, para purificação e isolamento, uma alçada de cada tubo foi transferida e estriada em placas de Petri com meio específico para cada bactéria: *Pseudomonas Agar Base* para as *Pseudomonas* spp., e Ágar Palcam para *L. monocytogenes* que foram incubados por 24 horas a 37 °C. Após este período, uma colônia isolada de cada bactéria foi destinada para a extração de DNA.

2.3 Extração do DNA

O DNA de cada isolado foi extraído utilizando o Kit de Extração de DNA Mini Spin da marca Kasvi®, seguindo os procedimentos descritos pelo fabricante.

2.4 RAPD –PCR

Para a reação de RAPD no DNA dos isolados de *Listeria monocytogenes* foi utilizado o *primer* UBC127 (5'CTG-GCG-GCT-G3') ([25]), com as condições de amplificação descritas por LEE *et al*., (17), 94 °C por 4 minutos, 45 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 36 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos e uma extensão final de 72 °C por 4 minutos. Já para o DNA dos isolados de *Pseudomonas* spp., utilizou-se o *primer* BOXA1R (5'CTA-CGG-CAA-GGC-GAC-GCT-GAC-G3'), com as seguintes condições de amplificação de um ciclo de 95 °C por 7 minutos, 45 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 53 °C por 1 minuto, 65 °C por 8 minutos e uma extensão final de 65 °C por 16 minutos ([15]). Em ambas as reações foi utilizado um volume total de reação de 20 µL, composta por 10 µL de GoTaq® Green MasterMix da PROGEMA, (2x Tampão de reação, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP e 3 mM MgCl₂), 2 µL de primer, 2 µL de DNA molde e 6 µL de água ultrapura.

2.5 Eletroforese

Os produtos de amplificação foram submetidos em eletroforese em gel de agarose 0,5% para *Listeria monocytogenes* e 1% para *Pseudomonas* spp. foram aplicados no gel 10 µL do produto amplificado de cada amostra. A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X (tampão Trisacetato 40 mM contendo EDTA 1 mM, pH 8) a uma tensão constante de 50 Voltz durante 80 minutos. O gel de

agarose foi corado com SYBR SAFE® e visualizado com transiluminador sob luz UV. Foi utilizado como marcador de peso molecular DNA lambda 100 pb

2.6 Análise dos Géis

As imagens dos géis, com os perfis de produtos amplificados após separação eletroforética, foram analisadas com auxílio do programa GelComparII® (versão 6.6, Applied Maths Inc., Sint-Martns-Latem, Belgium). A similaridade foi calculada pela correlação de Person's e para aglomeração e construção do dendograma usando o algoritmo UPGMA.

3. Resultados e Discussão

Analisando a Figura 1 é possível inferir a existência de 4 grupos de perfis genéticos para os isolados de *L. monocytogenes* da cadeia de carne de frango analisada. Embasado no critério de Caldera *et al.* ([15]), foram agrupados perfis genéticos com similaridade igual ou superior a 60%.

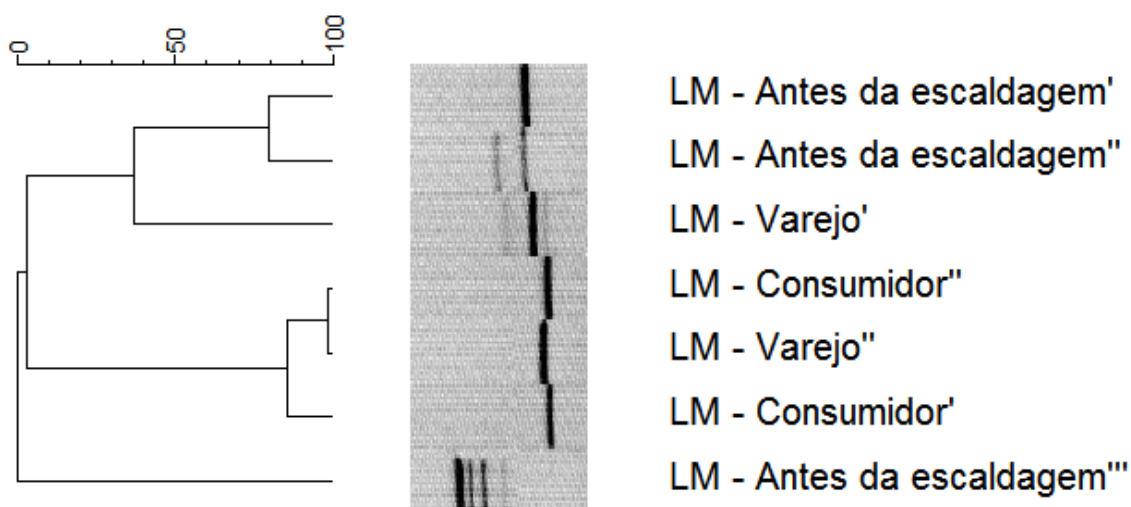


Figura 1. Dendograma gerado após análise de RAPD de *Listeria monocytogenes* com primer UBC127.

Analisando os grupos verificou-se que dois isolados antes da escaldagem foram classificados como sendo da mesma linhagem, enquanto um terceiro isolado do mesmo ponto apresentou um perfil diferente, sendo classificado como sendo de outra linhagem. Em relação aos isolados do varejo e consumidor, verificou-se a existência de duas linhagens distintas: uma referente a um isolado

do varejo e outra englobando três isolados, sendo dois do consumidor e um do varejo.

De acordo com este mapeamento é possível afirmar que os isolados de *Listeria monocytogenes* do ambiente industrial não foram encontrados no varejo e no consumidor. Porém, isolados do varejo foram encontrados no consumidor, indicando possíveis falhas entre a comercialização e os procedimentos realizados no ambiente doméstico, que permitiram a contaminação e permanência destes isolados nas amostras.

Um dos fatores que possivelmente contribuíram para que os isolados de *Listeria monocytogenes* no ambiente industrial (isolados antes da escaldagem) não fosse encontrada no varejo e no consumidor, é o fato dessa etapa ser um processo que consiste em passar a ave inteira em uma solução aquosa a uma temperatura 60 ± 5 °C, e esta temperatura pode ter favorecido a eliminação das bactérias [26]. Mendonça *et al.* [27], analisando frangos refrigerados de mercearias locais do sul do Rio Grande do Sul, encontraram diferentes grupos de *Listeria monocytogenes*, sugerindo que a contaminação foi proveniente de diferentes pontos de contaminação, devido a uma ineficiência dos procedimentos de limpeza e sanitização. Cruz *et al.* [28] em seu estudo encontraram diferentes tipos de *Listeria monocytogenes* entre a matéria-prima e o produto final de uma linha de processamento de salmão, sugerindo que algumas espécies podem diminuir ou aumentar com relação aos processos que são utilizados ao longo da cadeia produtiva de um produto. Von Laer *et al.* [29] não encontraram *L. monocytogenes* em matérias-primas para produção de salsicha, mas encontraram no ambiente, nos equipamentos e no produto final. Porém, as estirpes encontradas no produto final eram diferentes das que foram isoladas no ambiente e nos equipamentos, sugerindo que algumas cepas estão mais adaptadas apenas para esses ambientes.

Keeratipibul e Techaruwichit [18] analisaram a planta de processamento de frango assado na Tailândia e encontraram isolados de diferentes espécies de *Listeria* spp - dentre elas, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. seeligeri* em diferentes concentrações na superfície e equipamentos utilizados e no produto final. Estes resultados sugerem que as bactérias podem sobreviver

no ambiente de produção e que, embora na maioria dos casos a contaminação não possa ser completamente eliminada, é necessário controlá-la a um nível mais baixo. O projeto sanitário do equipamento e o *design* apropriado da planta são cruciais para controlar a contaminação microbiana. Além disso, é preciso o procedimento correto, apropriado e frequente de limpeza e higienização dos equipamentos e do ambiente de processamento e das mãos dos manipuladores

De tal forma, a manipulação que os produtos cárneos sofrem no ambiente de comercialização, representa um risco para a contaminação do produto [27]. Franzetti e Scarpellini [30], quando analisaram diferentes alimentos de origem animal, como hambúrguer de frango, carne moída, sushi e queijo frescal. Notaram que produtos muito manuseados acabam sendo fontes de contaminação, principalmente quando as condições higiênico-sanitárias do local de manipulação são precárias.

O dendograma obtido para *Pseudomonas* spp. (Figura 2) demonstra uma elevada diversidade genética dentre os isolados e quando se delimita um nível de similaridade de 60% [15], foram observados seis agrupamentos de isolados diferentes (A, B, C, D, E, F).

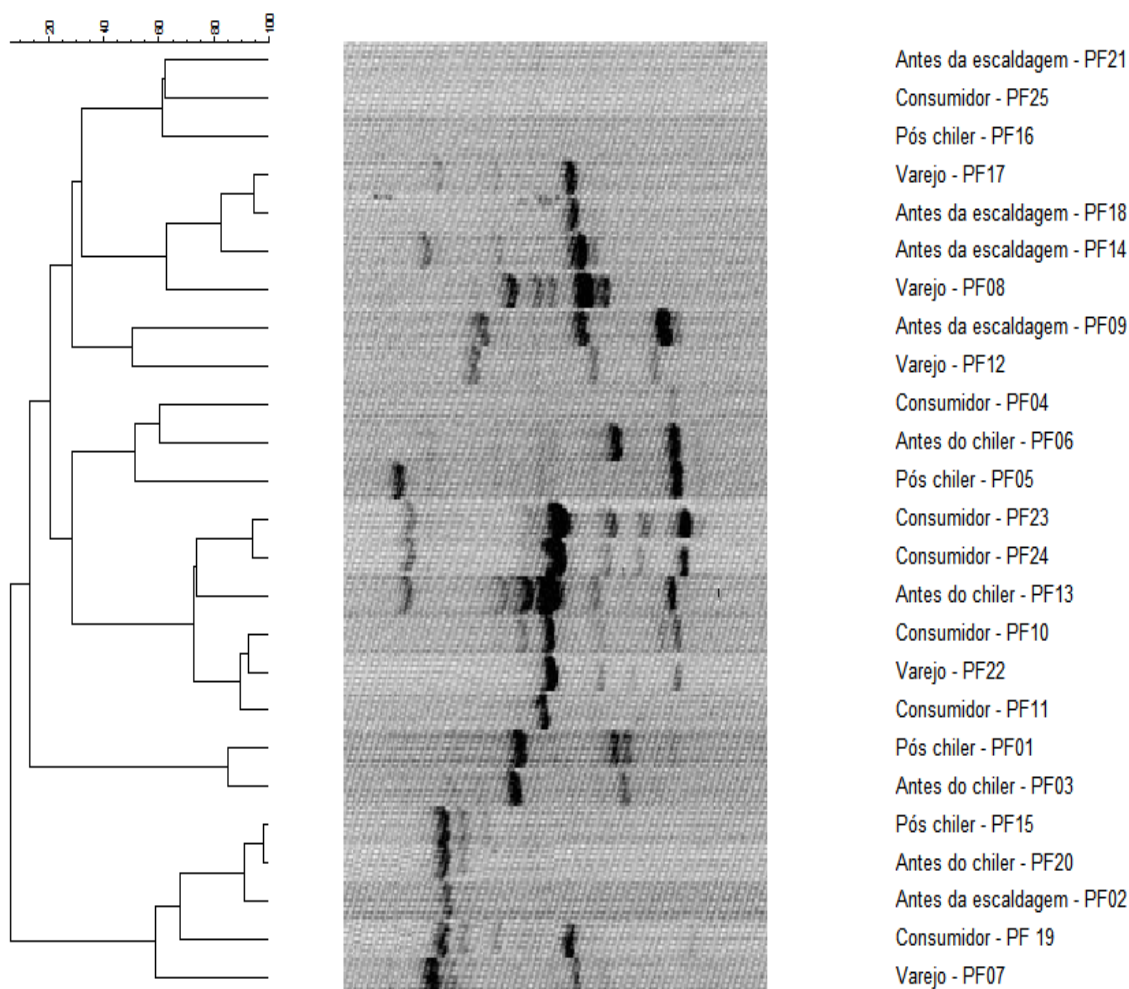


Figura 2. Dendrograma gerado após análise de RAPD de *Pseudomonas* spp. com primer BOXA1R.

Dentro de cinco grupos (A, B, C, D e F) foi possível agregar isolados do ambiente industrial, varejo e consumidor, indicando que a contaminação do ambiente industrial permaneceu até o final da cadeia. Isso denota uma situação preocupante considerando que *Pseudomonas* spp. são capazes de produzir biofilmes, e através desses conseguem se fixar em equipamentos ou no próprio produto. Além disso, ao formar um biofilme outras bactérias podem interagir e complementar o biofilme, inclusive *L. monocytogenes*, tornando desta forma o biofilme um ponto de contaminação cruzada de diferentes espécies, mais resistente aos processos de higienização ([1], [31]).

Ordóñez *et al* [1] descreve que animais sadios não apresentam contaminação em seu interior, e quando apresentam esta contaminação é em

baixa concentração. É durante o abate e processamento que ocorre a contaminação dos produtos

A presença de micro-organismos nos equipamentos de processamento de alimentos apresenta um risco potencial de contaminação cruzada, pois podem colonizar e multiplicar-se na superfície dos equipamentos, ou simplesmente permanecerem viáveis, incapazes de se multiplicar, devido as condições ambientais adversas às quais estão submetidos durante o processamento [32]. Uma das formas de *Pseudomonas* serem capazes de se fixar em superfícies de processamento de alimentos é formar biofilmes o que cria uma fonte permanente de contaminação dentro das indústrias e, conseqüentemente, contaminação cruzada dos produtos finais ([33], [34], [35]). Além disso, a formação dessa estrutura pode permitir a contaminação por outros micro-organismos, como *Listeria monocytogenes* [36]. Este aspecto é importante para a determinação dos pontos críticos de controle de contaminação, como parte de qualquer sistema Análise dos Pontos de Perigos e Controle Crítico [37].

O crescimento de *Pseudomonas* spp. na carne é acompanhado de intensa atividade proteolítica, o que resulta em evidente acréscimo dos níveis de nitrogênio não proteico. Segundo Antunez *et al.* [38], a formação de amônia, durante o processo de deterioração da carne está relacionada com diversos processos enzimáticos autolíticos e/ou microbianos, que, por sua vez, dependem das condições e do tempo de armazenamento.

Outro fator preocupante das *Pseudomonas* spp. é a produção de lipases e proteases, enzimas que propiciam a degradação das macromoléculas presentes na carne, provocando alterações sensoriais perceptíveis e diminuindo a vida útil do produto ([1], [31]).

4. Conclusão

A contaminação por *L. monocytogenes* encontrada no consumidor e varejo não é proveniente do ambiente industrial e os isolados do varejo chegaram até o consumidor. Os isolados de *Pseudomonas* spp. do ambiente industrial chegaram até o consumidor, denotando que são necessárias

mudanças nas práticas higiênico sanitárias durante toda a cadeia da carne de frango.

5. Referências

1. Ordóñez, J. A., Rodríguez, M. I. C., Álvarez, L. F., Sanz, M. L. G., Minguillón, G. D. G. F., Perales, L. H., & Cortecero, M. D. S. *Tecnología de Alimentos: Alimentos de origem animal*. Porto Alegre: Artmed, 2005, v. 2.
2. Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 2017. 75, 1–13. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>
3. Kaur, J., Lee, S., Park, Y. S., & Sharma, A. RAPD analysis of *Leuconostoc mesenteroides* strains associated with vegetables and food products from Korea. *LWT - Food Science and Technology*, 2017, 77, 383–388. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.078>
4. Stellato, G., Utter, D. R., Voorhis, A., De Angelis, M., Murat Eren, A., & Ercolini, D. A few *Pseudomonas* oligotypes dominate in the meat and dairy processing environment. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 8(MAR), 1–9. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00264>
5. Chen, M., Wu, Q., Zhang, J., Yan, Z., & Wang, J. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail-level ready-to-eat foods in South China. *Food Control*, 2014, 38(1), 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.061>
6. Doumith, M., Cazalet, C., Simoes, N., Frangeul, L., Jacquet, C., Kunst, F., ... Buchrieser, C. New aspects regarding evolution and virulence of *L. monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infection and Immunity*, 2004, 72(2), 1072–83. <http://doi.org/10.1128/IAI.72.2.1072>
7. LIU, M.; WANG, H.; GRIFFITHS, M.W. Regulation of alkaline metalloprotease promotor by N-acyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, p. 2174–2184, 2007.
8. Carpentier, B., & Cerf, O. Review--Persistence of *Listeria monocytogenes* in

food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 145(1), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005>

9. RIVOAL, K., et al. Detection of *Listeria* spp. in liquid egg products and in the egg breaking plants environment and tracking of *Listeria monocytogenes* by PFGE. *International Journal of Food Microbiology*, v. 166, n. 1, p. 109–116, ago., 2013.

10. Tao, T., Chen, Q., Bie, X., Lu, F., & Lu, Z. Investigation on prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in animal-derived foods by multiplex PCR assay targeting novel genes. *Food Control*, 2017, 73, 704–711. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.026>

11. Du, X. jun, Zhang, X., Wang, X. yi, Su, Y. lan, Li, P., & Wang, S. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* in Chinese food obtained from the central area of China. *Food Control*, 2017, 74, 9–16. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.024>

12. Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I., & Villani, F. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology*, 2009, 26(2), 228–231. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2008.09.005>

13. SILVA, N., et al. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água*. 4ª ed. Varela: São Paulo, 2010.

14. Scaccabarozzi, L., Leoni, L., Ballarini, A., Barberio, A., Locatelli, C., Casula, A., ... Moroni, P. *Pseudomonas aeruginosa* in Dairy Goats: Genotypic and Phenotypic Comparison of Intramammary and Environmental Isolates. 2015 *PloS One*, 10(11), e0142973. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0142973>

15. Caldera, L., Franzetti, L., Van Coillie, E., De Vos, P., Stragier, P., De Block, J., & Heyndrickx, M. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. *Food Microbiology*, 2016, 54, 142–153. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.004>

16. MARCHAND, S., et al. Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, v. 133, p. 68–77.
17. Lee, H. Y., Chai, L. C., Pui, C. F., Tunung, R., Wong, W. C., Shuhaimi, M., ... Son, R. Using RAPD-PCR as molecular assessment on the performance of CHROMAgar® *Listeria* and PALCAM agar on isolation of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* from foods. *International Food Research Journal*, 2011, 18(2), 501–56.
18. Keeratipibul, S., & Techaruwichit, P. Tracking sources of *Listeria* contamination in a cooked chicken meat factory by PCR-RAPD-based DNA fingerprinting. *Food Control*, 2012, 27(1), 64–72. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.026>
19. Lambertz, S. T., Ivarsson, S., Lopez-Valladares, G., Sidstedt, M., & Lindqvist, R. Subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from retail ready-to-eat foods, processing plants and listeriosis patients in Sweden 2010. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 166(1), 186–92. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.008>
20. Heir, E., Lindstedt, B.-A., Røtterud, O.-J., Vardund, T., Kapperud, G., & Nesbakken, T. Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 96(1), 85–96. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.014>
21. Jadhav, S., Bhawe, M., & Palombo, E. A. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*, 2012, 88(3), 327–341. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.01.002>
22. Kovačević, J., Mesak, L. R., & Allen, K. J. Occurrence and characterization of *Listeria* spp. in ready-to-eat retail foods from Vancouver, British Columbia. *Food Microbiology*, 2012 30(2), 372–378. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.015>
23. Jamali, H., & Thong, K. L. Genotypic characterization and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat foods. *Food Control*, 2014, 44, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.038>

24. Zeinali, T., Jamshidi, A., Rad, M., & Bassami, M. A comparison analysis of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from chicken carcasses and human by using RAPD PCR. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(6), 10152–10157. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26309714>
25. DESTRO, M., T. *Listeria monocytogenes* em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado. Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade em Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos. São Paulo, SP-BR, 1995.
26. Brasil. PORTARIA Nº 210 DE 10 DE NOVEMBRO DE 1998 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico Sanitária de Carnes de Aves, 1998.
27. Mendonça, K. S., Michael, G. B., Ribeiro, M., & Cardoso, I. Genotypic profile of *Listeria* in refrigerated chickens in southern Rio Grande do Sul, Brazil. *Cienc. Rural*, Santa Maria, 2016, v. 46, n. 1, p. 132-137, jan.
28. CRUZ, C. D., Silvestre, F. A., Kinoshita, E. M., Landgraf, M., Franco, B. D. G. M., Destro, M. T. Epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in a gravlax salmon processing line. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2008, v. 39, p. 273-383.
29. Von Laer, A. E., Lima, A. S. de, Trindade, P. dos S., Andriguetto, C., Destro, M. T., & Silva, W. P. da. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a fresh mixed sausage processing line in Pelotas-RS by PFGE. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2009, 40(3), 574–582. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822009000300021>
30. Franzetti, L., & Scarpeluni, M. Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology*, 2007, 57(1), 39–47. <http://doi.org/10.1007/BF03175048>
31. JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
32. Verran, J. Biofouling in Food Processing: Biofilm or Biotransfer Potential? *Food and Bioproducts Processing*, 2002, 80(4), 292–298.

<http://doi.org/10.1205/096030802321154808>

33. Sofos, J. N., & Geornaras, I. Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Science*, 2010, 86(1), 2–14. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.015>

34. Orgaz, B., Lobete, M. M., Puga, C. H., & Jose, C. S. Effectiveness of chitosan against mature biofilms formed by food related bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12(1), 817–828. <http://doi.org/10.3390/ijms12010817>

35. Renier, S., Hébraud, M., & Desvaux, M. Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: An additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(4), 835–850. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02378.x>

36. Chung, M. S., Lee, J. H., & Min, D. B. Effects of *Pseudomonas putrefaciens* and *Acinetobacter* spp. on the Flavor quality of raw ground beef. *Journal of Food Science*, 2002, 67(1), 77–83.

37. Cleto, S., Matos, S., Kluskens, L., & Vieira, M. J. Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. 2012, *PLoS ONE*, 7(6). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0040189>

38. Antunez, H. C. da S., Costa, C. S., Silva, W. P. da, & Soares, G. J. D. Efeito do ácido láctico e da radiação gama na eliminação de *Pseudomonas* spp. e na produção de amônia em peito de frango desossado resfriado. *Alim. Nutr.*, 2006, 17, 367–372.

Ilustrações

Figura 2. Dendograma gerado após análise de RAPD de *Listeria monocytogenes* com primer UBC127..... Página 8

Figura 2. Dendograma gerado após análise de RAPD de *Pseudomonas* spp. com primer BOXA1R.....Página 10

6. Considerações finais

O presente estudo demonstrou que a contaminação por *L. monocytogenes* encontrada no ambiente do consumidor e varejo não é proveniente do ambiente industrial. Porém, esses isolados do varejo chegaram até o consumidor, e possuem uma similaridade superior a 60%. Com relação a *Pseudomonas* spp., foi possível verificar que os isolados do ambiente industrial chegaram até o consumidor.

Dessa forma, é possível que o processo de escaldagem tenha eliminado as *L. monocytogenes*, mas que o mesmo não tenha ocorrido com *Pseudomonas* spp. Denota-se, então, que são necessárias mudanças nas práticas higiênico sanitária durante toda a cadeia da carne de frango.

7. Referências

- ABERC (Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas). **Manual Aberc de práticas de elaboração e serviço de refeição para coletividades**. 11ªed. São Paulo, 2015, 274 p.
- ABPA (Associação Brasileira de Proteína Animal). **Relatório Anual de Atividades 2016**. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf>. Acesso em: 28 de Julho 2017.
- ALAVI, H. E. D.; HANSEN, L. T. Kinetics of biofilm formation and desiccation survival of *Listeria monocytogenes* in single and dual species biofilms with *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia proteamaculans* or *Shewanella baltica* on food-grade stainless steel surfaces. **Biofouling**, v.29, p. 1253–1268, 2013.
- ALCANTARA, M; MORAIS, I. C. L., SOUZA, C. M. O. C. C. Principal Microorganisms involved in the decay of sensory characteristics of meat products **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal** (v.6, n.1) p. 1 – 18 jan – jun, 2012.
- ANTUNEZ, H. E. S. *et al.* Efeito do ácido láctico e da radiação gama na eliminação de *Pseudomonas* spp. e na produção de amônia em peito de frango desossado resfriado. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n.4, p. 367-372, 2006.
- BARANCELLI, G. V. *et al.* Pulsed-Field Gel Electrophoresis characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cheese manufacturing plants in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 173, p. 21-9, 2014.
- BARBOSA, M. de S. *et al.* Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. **Food Microbiology**, v. 46, p.254-262, abr., 2015.
- BOER, E.; BEUMER, R. R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 50, n. 1-2, p.119-130, set., 1999.
- BORGES, T. S. B.; FREITAS, A. S.. Aplicação do sistema *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCO) no processamento de carne bovina fresca. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.20, n.1, p. 1-18, Jan-Jun, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RDC, n. 12, de 2 de janeiro de 2001**. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, em seus anexos I e II.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RDC, n. 275, de 21 de outubro de 2002**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria, n. 210, de 10 novembro de 1998**. Regulamento Técnico Da Inspeção Tecnológica E Higienico-Sanitária De Carne De Aves.

BRITO, J. R., *et al.* Retail survey of Brazilian milk and minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. ***Appl. Environ. Microbiol***, v. 74, p. 4954–4961, 2008.

BUCHANAN, R. L. *et al.* A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. ***Food Control***, v. 75, p.1-13, maio, 2017.

BUENO, M. P. *et al.* Gestão da Qualidade nos Frigoríficos de Abate e Processamento de Frangos em Mato Grosso do Sul. In: **XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**, 2007. Londrina. Anais de Congresso.

CALDERA, L. *et al.* Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. ***Food Microbiology***, v. 54, p.142-153, abr., 2016.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Review-Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. ***International Journal of Food Microbiology***, v. 145, n. 1, p. 1–8, jan., 2011.

CARPENTIER, B.; CHASSAING, D. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. ***International Journal of Food Microbiology***, v. 97, n. 2, p.111-122, dez. 2004.

CARVALHO, A. C. F. B., *et al.* Presença de microrganismos mesófilos, psicotróficos e coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. **Arquivo Instituto Biologia**, São Paulo, v.72, n.3, p.303-307, jul./set., 2005.

CHAMBEL, L., *et al.* Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, 52–63, 2007.

CHEN, M., *et al.* Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail-level ready-to-eat foods in South China. **Food Control**, v. 38, p.1-7, abr., 2014.

CHUNG, M. S., LEE, J. H., MIN, D. B. Effects of *Pseudomonas putrefaciens* and *Acinetobacter* spp. on the flavor quality of raw ground beef. **Journal Of Food Science**, v. 67, n. 1, 2002.

CLETO S., *et al.* Characterization of Contaminants from a Sanitized Milk Processing Plant. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, e40189, 2012.

CRUZ, C. D. *et al.* Epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in a gravlax salmon processing line. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 273-383, 2008.

D'AMICO, D. J., DONNELLY, C. W. Detection, isolation, and incidence of *Listeria* spp. in small-scale artisan cheese processing facilities: a methods comparison. **J. Food Prot.**, v. 72, p. 2499–2507, 2009.

DAUPHIN, G.; RAGIMBEAU, C.; MALLE, P. Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 51–61, 2001.

DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes* em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado. 1995. **Tese (doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1995.**

DOUMITH, M., *et al.* New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. ***Infect. Immun.***, v. 72, p.1072–1083, 2004.

DU, X., *et al.* Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* in Chinese food obtained from the central area of China. ***Food Control***, v. 74, p.9-16, abr., 2017.

DUFOUR, D., *et al.* Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them. ***International Journal of Food Microbiology***, v. 125, p. 188–196, 2008.

ERCOLINI, D., *et al.* Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. ***Food Microbiology***, v. 26, n. 2, p.228-231, abr., 2009.

FERREIRA, V., *et al.* Diverse Geno- and Phenotypes of Persistent *Listeria monocytogenes* Isolates from Fermented Meat Sausage Production Facilities in Portugal. ***Applied And Environmental Microbiology***, v. 77, n. 8, p.2701-2715, mar., 2011.

FORSYTHE, S. J. ***Microbiologia da Segurança Alimentar***. São Paulo: Artmed, 2002.

FRANZETTI, L. & SCARPELLINI, M. Characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. ***Annals of Microbiology***, v. 57, n. 1, p. 39-47, 2007.

FREITAS, G. S. R. Avaliação do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle em um matadouro-frigorífico de aves. 2011. 36 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

FRYE, C., DONNELLY, C. W. Comprehensive survey of pasteurized fluid milk produced in the United States reveals a low prevalence of *Listeria monocytogenes*. ***J. Food Prot.***, v. 68, p. 973–979, 2005.

GALARZ, L. A.; FONSECA, G. G.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Microbial growth in chicken breast products during supply chain simulation. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***, Campinas, 30(4): 870-877, out.-dez. 2010.

GALVÃO, N. N., *et al.* PFGE characterisation and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities. ***Meat science***, v. 92, n. 4, p. 635–43, dez., 2012.

GANDRA, E. A., *et al.* Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GIAOURUS, E., *et al.* Co-Culture with *Listeria monocytogenes* within a Dual-Species Biofilm Community Strongly Increases Resistance of *Pseudomonas putida* to Benzalkonium Chloride. **PLOS ONE**, v. 8, n., e77276, 2013.

GUDMUNDSDÓTTIR, S., *et al.* Tracing *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis. **International journal of food Microbiology**, v. 101, n. 1, p. 41–51, maio, 2005.

HALTER, E. L.; NEUHAUS, K.; SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. **International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 2, p.641-647, abr. 2012.

HEIR, E., *et al.* Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, n. 1, p.85-96, out., 2004.

IBUSQUIZA, P. S. S.; HERRERA, J. J.; CABO, M. L. Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiol.**, v. 28, p. 418-425, 2011.

JADHAV, S.; BHAVE, M.; PALOMBO, E. A. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 88, n. 3, p.327-341, mar., 2012.

JAMALI, H; THONG, K. L. Genotypic characterization and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat foods. **Food Control**, v. 44, p.1-6, out., 2014.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KASNOWSKI, M. C., *et al.* Formação De Biofilme Na Indústria De Alimentos E Métodos De Validação De Superfícies. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, n. 15, p. 1679-7353, jul., 2010.

KAUR, J., *et al.* RAPD analysis of *Leuconostoc mesenteroides* strains associated with vegetables and food products from Korea. **Lwt - Food Science And Technology**, v. 77, p. 383-388, abr., 2017.

KEERATIPIBUL, S.; TECHARUWICHIT, P. Tracking sources of *Listeria* contamination in a cooked chicken meat factory by PCR-RAPD-based DNA fingerprinting. **Food Control**, v. 27, n. 1, p.64-72, set., 2012.

KONEMAN, E. W. (Organizador). **Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas Colorido**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 1465p.

KOVAČEVIĆ, J.; MESAK, L. R.; ALLEN, K. J. Occurrence and characterization of *Listeria* spp. in ready-to-eat retail foods from Vancouver, British Columbia. **Food Microbiology**, v. 30, n. 2, p.372-378, jun., 2012.

LAMBERTZ, S., *et al.* Thisted *et al.* Subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from retail ready-to-eat foods, processing plants and listeriosis patients in Sweden 2010. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 1, p.186-192, ago., 2013.

LEE, H. Y., *et al.* Using RAPD-PCR As Molecular Assessment On the Performance of CHROMAgar™ *Listeria* and PALCAM Agar On Isolation of *Listeria* Spp. and *L. Monocytogenes* From Foods. **International Food Research Journal**, v. 18, p.501-506, 2011.

LIU, M.; WANG, H.; GRIFFITHS, M.W. Regulation of alkaline metalloprotease promotor by N-acyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2174–2184, 2007.

LOMONACO, S., *et al.* Comparison of two AFLP methods and PFGE using strains of *Listeria monocytogenes* isolated from environmental and food samples obtained from Piedmont, Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, p. 177–182, 2011.

MALORNY, B., *et al.* Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 1, p.39-48, maio, 2003.

MANSO, I. J. Sistema da qualidade em abatedouros de aves. **Estágio supervisionado**. Universidade Tecnológica Federal Do Paraná. 17p. 2014.

MARCHAND, S., *et al.* Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, p. 68–77, 2009.

MATHEUS, D.P.; RUDGE, A.C.; GOMES, S.M.M. Ocorrência de *Salmonella* spp em carne de frango comercializada no município de Bauru, SP, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.62, n.2, p.111-115, 2003.

MENDONCA, K. S., *et al.* Genotypic profile of *Listeria monocytogenes* isolated in refrigerated chickens in southern Rio Grande do Sul, Brazil. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 1, p. 132-137, jan., 2016.

MESQUITA, M. O., *et al.* Qualidade microbiológica no processamento de frango assado em unidade de alimentação e nutrição. **Ciência e tecnologia de alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 198-203, jan-mar, 2006.

NOGUEIRA, K. M. O. D. APPCC: análise de perigos e pontos críticos de controle em abate de aves. 2010. 65 f. **Monografia (Especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal)** – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Castelo Branco, São Paulo, 2010.

Ordóñez, J. A., *et al.* **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, v. 2. 2007.

ORGAZ, B., *et al.* Effectiveness of chitosan against mature biofilms formed by food related bacteria. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 817–828, 2011.

PACHECO, D.O. Qualidade microbiológica da cadeia de carne de aves da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. 2014. 113f. **Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas)** – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

PAN, Y., BREIDT JR., F., KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 7711–7717, 2006.

PUJURRA, S. Parâmetros do controle de qualidade em abatedouro de aves. Área: Gestão de qualidade de alimentos. 2013. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Universidade Federal do Paraná. Palotina, 2013.

Renier, S., Hébraud, M., & Desvaux, M. Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: An additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 835–850, 2011.

RIEU, A., *et al.* Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 76–82, 2008.

RIVOAL, K., *et al.* Detection of *Listeria* spp. in liquid egg products and in the egg breaking plants environment and tracking of *Listeria monocytogenes* by PFGE.

International Journal of Food Microbiology, v. 166, n. 1, p. 109–16, ago., 2013.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P., *et al.* Listeria monocytogenes-carrying consortia in food industry. Composition, subtyping and numerical characterisation of mono-species biofilm dynamics on stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 206, p. 84–95, ago., 2015.

RUBIO, R. *et al.*, Assessment of safe enterococci as bioprotective cultures in low-acid fermented sausages combined with high hydrostatic pressure. **Food Microbiology**, v. 33, n. 2, p.158-165, abr., 2013.

RYSER, E. T. Incidence and behaviour of Listeria monocytogenes in unfermented dairy products. In: Ryser, E. T., Marth, E. H. (Eds.). Listeria, Listeriosis and Food Safety. 3ª ed. CRC Press, 2007.

SAIYUDTHONG, S.; TREVANICH, S. An Optimized EMA-RAPD-PCR for a Reliable Detection of Viable Salmonella spp. in Chicken Products. **Journal of Food Safety**, v. 33, n. 3, p.247-258, maio, 2013.

SCACCABAROZZI, L., *et al.* Pseudomonas aeruginosa in Dairy Goats: Genotypic and Phenotypic Comparison of Intramammary and Environmental Isolates. **PLOS ONE**, 10(11) , 2015.

SILVA, N., *et al.* **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4ª ed. Varela: São Paulo, 2010.

SOFOS, J. N.; GEORNARAS, I. Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of Escherichia coli O157:H7 in nonintact, and Listeria monocytogenes in ready-to-eat, meat products. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 2–14, 2010.

SOUZA JUNIOR, L. C. T. Avaliação Microbiológica De Carcaças De Frango E Água Em Um Sistema De Pré-Resfriamento Por Imersão Em 8 Horas E 16 Horas. **Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2009.

SOUZA, G. C., *et al.* Característica microbiológica da carne de frango. **ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 10, n. 1, p. 12-17, jan/mar, 2014.

STELLATO, G., *et al.* A Few Pseudomonas Oligotypes Dominate in the Meat and Dairy Processing Environment. **Front. Microbiol.**, 8, p.264, 2017.

TAO, T., *et al.* Investigation on prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria* monocytogenes in animal-derived foods by multiplex PCR assay targeting novel genes. **Food Control**, v. 73, p.704-711, mar., 2017.

TODD, E. C. D.; NOTERMANS, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.22, p. 1484–1490, 2011.

TOLEDO, J. C. Gestão da qualidade na agroindústria. In: BATALHA, M. O. (Organizador). **Gestão agroindustrial**. 2ª ed. São Paulo: Atlas, 2001.

USDA (United States Department of Agriculture). **Livestock and poultry: World Markets and Trade**. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf> Acesso em: 02 de Julho de 2017.

VAN DER VEEN, S.; ABEE, T. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 421–431, 2011.

Veran, J. Biofouling in food processing: Biofilm or biotransfer potential. **Food and Bioproducts Processing**, v. 80, p. 292–298, 2002.

VOLOSKI, F. L. S. Qualidade microbiológica do processamento de cortes de carne bubalina resfriado acondicionado a vácuo. 40f. **Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos)** – Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2014.

VON LAER, A. E., *et al.* Characterization of *Listeria Monocytogenes* isolated from a fresh mixed sausage processing line in Pelotas-Rs By Pfg. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 574-582, 2009.

WAGNER, M., *et al.* Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from 50 small-scale Austrian cheese factories. **J. Food Prot.**, v. 69, p. 1297–1303, 2006.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

WILKS, S. A.; MICHELS, H. T.; KEEVIL, C. W. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: implications for cross-contamination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 93–98, 2006.

ZEINALI, T., *et al.* A comparison analysis of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from chicken carcasses and human by using RAPD PCR. ***International Journal of Clinical and Experimental Medicine***, v.8, n. 6, 2015.

ZHANG, Y., *et al.* Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. ***International Journal of Food Microbiology***, v. 113, p. 47–53, 2007.