

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO ANIMAL E MEDICINA VETERINÁRIA
PREVENTIVA

ANÁLISE ESPACIAL E DETECÇÃO MOLECULAR DE *Listeria*
monocytogenes EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO PROCEDENTES
DE TANQUES DE RESFRIAMENTO DE PEQUENAS PROPRIEDADES
RURAIS

JACKIELINE SAMPAIO STEINLE

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO ANIMAL E MEDICINA VETERINÁRIA
PREVENTIVA

ANÁLISE ESPACIAL E DETECÇÃO MOLECULAR DE *Listeria*
monocytogenes EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO PROCEDENTES
DE TANQUES DE RESFRIAMENTO DE PEQUENAS PROPRIEDADES
RURAIS

JACKIELINE SAMPAIO STEINLE

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em Saúde Animal,
Saúde Pública Veterinária e Segurança
Alimentar.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis
Coorientadora: Dra. Maria Izabel Merino de
Medeiros

BOTUCATU – SP
Setembro - 2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Steinle, Jackieline Sampaio.

Análise espacial e detecção molecular de *Listeria Monocytogenes* em amostras de leite bovino procedentes de tanques de resfriamento de pequenas propriedades rurais / Jackieline Sampaio Steinle. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Simone Baldini Lucheis

Coorientador: Maria Izabel Merino de Medeiros

Capes: 50502000

1. Leite. 2. *Listeria*. 3. Diagnóstico molecular. 4. Saúde única. 5. Zoonoses.

Palavras-chave: Leite cru; *Listeria* spp; Molecular diagnosis; One Health; Zoonose.

Jackieline Sampaio Steinle

ANÁLISE ESPACIAL E DETECÇÃO MOLECULAR DE *Listeria monocytogenes*
EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO PROCEDENTES DE TANQUES DE
RESFRIAMENTO DE PEQUENAS PROPRIEDADES RURAIS.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e
Segurança Alimentar.

Comissão examinadora

Prof^a. Dra. Simone Baldini Lucheis

Presidente e Orientadora

Depto de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ - UNESP- Botucatu

Prof. Dr. Juliano Gonçalves Pereira

Membro da Banca

Depto de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ- UNESP- Botucatu

Prof. Dr. Rafael Fagnani

Membro da Banca

Depto de Medicina Veterinária Preventiva / UEL – Londrina - Paraná

Data da defesa: 30 de setembro de 2022.

Dedicatória

Pai,

Sentimentos não cabem em palavras... Você está sempre comigo, sua risada ecoa e preenche o vazio da sua presença. Obrigada por ser meu maior incentivador e porto seguro. Obrigada por se doar em vida à nossa família.

Agradecimento especial

Deus! Fonte inesgotável de amor e expansão! Por abençoar a minha vida diariamente e irradiar sobre mim Sua Luz.

Mae e pai, Cici e Antônio, por me darem a vida terrena, por serem exemplo de doação, hombridade e garra, por eu ter sido uma criança amada e alegre, por pentearem meus cabelos com tanto amor, por terem me dado duas irmãs, por abrirem mão de vossas vidas e dedica-las à construção de um lar feliz, divertido e rico em amor.

Flávia “Vinha” e Dani por estarem comigo em tantos aprendizados, aventuras, e mesmo longe torcerem por mim.

Aos irmãos que a vida me deu:

Rafinha “Tatinha”, que me ensinou que todos somos Um e que, em nossa individualidade, temos a missão de levar a cada ser o amor incondicional. Por estar comigo nessa jornada da vida e de mestrado, desde a inscrição até noites a fio estudando e motivando.

Iago Orlandi, homem incrível, que me ensinou a contemplar a vida e extrair o que há de melhor de todos os momentos.

Gabriel Michel, que sempre esteve comigo, mesmo de longe. O tempo nunca passou para nós.

Yago Antônio e Jefferson pelo acolhimento, pelas caminhadas filosóficas e conversas onde me apresentaram a esse “Universo”.

À Regina Botino e Carlos, por tornarem seu lar o meu refugio em todos os momentos. Pela confiança e conselhos que carrego pra vida.

Obrigada por fazerem do meu coração solo fértil para que o amor germinasse novamente.

Aos amigos Janaína Guerrero e Guilherme Gorjon, por cuidarem de mim e me “levarem para passear” durante todos esses anos de UNESP.

À professora Dra. Simone, espírito curioso, voltado à ciência e símbolo de união e fraternidade. Minha fonte de inspiração e motivação.

À equipe maravilhosa do LASAB, Su Manzini, Thainá, Iza e Isabel Medeiros, mulheres, cientistas e incríveis! Obrigada por me ensinarem muito além de biomol, pelas risadas e parceria. Sinto muito orgulho em fazer parte desse time.

A Janaina Prieto, minha conselheira generosa, sempre me auxiliando nas situações acadêmicas.

Ao professor Dr. Juliano Gonçalves Pereira, pelo ensinamento passado durante as aulas e pela disposição em ajudar além do esperado.

À UNESP, minha segunda casa, generosa, acolhedora, por ser um local rico de pessoas e profissionais brilhantes tão importantes na formação acadêmica e moral.

À FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (processo nº 2020/09409-2).

Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superar as adversidades. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

STEINLE, J. S. **ANÁLISE ESPACIAL E DETECÇÃO MOLECULAR DE *Listeria Monocytogenes* EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO PROCEDENTES DE TANQUES DE RESFRIAMENTO DE PEQUENAS PROPRIEDADES RURAIS**. 2022, 115 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2022.)

Resumo

A listeriose é uma zoonose, tendo-se como agente etiológico a bactéria *Listeria monocytogenes* (*L.monocytogenes*). Em seres humanos, caracteriza-se por ocasionar infecções graves, principalmente em idosos, crianças, pacientes imunossuprimidos, recém nascidos e mulheres grávidas. As manifestações clínicas incluem distúrbios gestacionais como abortamentos, natimortos e septicemia perinatal, além de quadros entéricos e neurológicos como meningites e encefalite. No Brasil, a prevalência de listeriose permanece desconhecida, devido à falta de vigilância epidemiológica da mesma, porém vem sendo relacionada a surtos da doença veiculada por alimentos, como uma das principais causas de morte em países desenvolvidos, caracterizando-se como um preocupante patógeno de origem alimentar. O leite e seus derivados, por serem alimentos ricos em nutrientes, caracterizam-se como excelente substrato para desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, sendo frequentemente relacionados a surtos de listeriose. Utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (PCR), investigou-se a presença de *L. monocytogenes* em 102 amostras congeladas de leite cru procedentes de tanques de resfriamento de pequenas propriedades rurais produtoras de leite de oito municípios. Para isso, foram utilizados os *primers* PRS, LM1/LM2, inIA, inIC e inIJ e, posteriormente, foi realizada a análise espacial da área para avaliar a distribuição das amostras positivas. Como resultado das análises moleculares, foi possível detectar o DNA da bactéria com a utilização dos *primers* PRS, inIJ e inIC. O *primer* PRS, que amplifica um segmento do gene *prs* (*Imo0509*), comum ao gênero *Listeria* detectou o DNA do patógeno em 21 das 102 amostras (20, 59%), enquanto o *primer* inIJ, que amplifica um segmento do gene *Imo2821* foram 23 amostras e com *primer* inIC (gene *Imo1786*) detectaram o agente em 22 amostras, resultando em uma prevalência de 22, 55% e 21,57%. Para os *primers* inIA e LM1/LM2, não houve amplificação. Houve

positividade em todos os municípios avaliados, com exceção de Bauru/SP. Tendo em vista a importância desta bactéria e seu impacto para a saúde pública, alerta-se para os riscos implicados ao consumo e comercialização do leite cru e de seus derivados, como queijo e manteiga, bem como para o impacto socioeconômico, uma vez que esses produtos são fonte de renda complementar de pequenos produtores de agricultura familiar.

Palavras-chave: One Health, *Listeria* spp., Leite cru, Zoonose, PCR.

STEINLE, J. S. **Spatial analysis and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in bovine milk samples from cooling tanks of small rural properties.** 2022, 115p. Dissertation (Master in Veterinary Medicine) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu, 2022.

Abstract

Listeriosis is a disease caused by the bacterium *Listeria monocytogenes* and in humans it is characterized by serious infections mainly in the elderly, children, immunosuppressed patients, newborns and pregnant women. Clinical manifestations include gestational disorders such as miscarriages, stillbirths and perinatal septicemia, as well as enteric and neurological conditions such as meningitis and encephalitis. In Brazil, the prevalence of listeriosis remains unknown, due to the lack of epidemiological surveillance of the same, but it has been related to outbreaks of the foodborne disease, as one of the main causes of death in developed countries, characterized as a worrisome foodborne pathogen. Milk and its derivatives, as they are nutrient-rich foods, are characterized as an excellent substrate for the development of spoilage and pathogenic microorganisms, being frequently related to outbreaks of listeriosis. Using the Conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, the presence of *L. monocytogenes* in 102 samples of raw milk from the cooling tanks of small rural milk-producing properties in eight municipalities was investigated. For this, *primers* PRS, LM1/LM2, *inlA*, *inlC* and *inlJ* were used and, later, spatial analysis of the area was performed to evaluate the distribution of positive samples. As a result of the molecular analyses, it was possible to detect the bacterial DNA using the PRS, *inlJ* and *inlC primers*. The PRS primer, which amplifies a segment of the *prs* gene (*lmo0509*), common to the *Listeria* genus, detected the pathogen DNA in 21 of 102 samples (20, 58%), while the *inlJ* primer, which amplifies a segment of the *lmo2821* gene, was 23 samples and with *inlC* primer (*lmo1786* gene) detected the agent in 22 samples, resulting in a prevalence of 22, 55% and 21.57%. For *primers inlA* and LM1/LM2, there was no amplification. There was positivity in all evaluated municipalities, with the exception of Bauru/SP. In view of the importance of this bacterium and its impact on public health, the risks involved in the consumption and commercialization of raw milk and its derivatives, such as cheese and butter, as well as the

socioeconomic impact since these products are are a source of supplementary income for small family farmers.

Keywords: Listeriosis, bulk tank milk, bovine, molecular, PCR, molecular diagnosis.

Lista de figura

Figura 1: Resumo gráfico relativo às interações entre agricultores, animais e meio ambiente, relacionados a eliminação de <i>L. monocytogenes</i> e transmissão interespecie.....	16
Figura 2: Ciclo de infecção celular por <i>L. monocytogenes</i> e fatores de virulência envolvidos nas etapas.....	18
Figura 3: Visão geral de infecção por <i>L. monocytogenes</i>	19
Figura 4: “A”, “B” e “C” amostras devidamente armazenadas, separadas e identificadas no laboratório. “D” amostras sendo aliquotadas em microtubos estéreis de 1,5mL, dentro da capela de fluxo laminar previamente esterilizada por 15 minutos sob luz UV, para serem submetidas à extração de DNA.....	22
Figura 5: “A” e “B”: amostras de leite submetidas a extração do DNA; “C” e “D”: quantificação das amostras extraídas.....	28
Figura 6: Mapa do Brasil.....	31
Figura 7: Mapa do Estado de São Paulo, Brasil.....	31
Figura 8: Municípios com amostras de leite bovino positivas para <i>L. monocytogenes</i>	32
Figura 9: Municípios com amostras de leite bovino positivas para o <i>primer</i> PRS.....	32
Figura 10: Municípios com amostras de leite bovino positivas para o <i>primer</i> inIJ.....	33
Figura 11: Municípios com amostras de leite bovino positivas para o <i>primer</i> inIC.....	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
2 REVISAO DE LITERATURA.....	11
2.1 <i>Listeria</i> spp.: características gerais.....	11
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i> : Histórico.....	12
2.3 Epidemiologia dos surtos.....	13
2.4 Fontes de contaminação do leite.....	15
2.5 Patogenia e fatores de virulência.....	17
2.6 A doença em humanos.....	19
2.7 Justificativa.....	20
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 Gerais.....	20
3.2 Específicos	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Comitê de Ética.....	21
4.2 Local de realização dos exames.....	21
4.3 Amostras de leite bovino a partir de tanques de expansão.....	22
4.4 Exames moleculares.....	23
4.4.1 Extração de DNA do leite para pesquisa de <i>L. monocytogenes</i>	23
4.4.2 Quantificação do DNA.....	23
4.4.3 Escolha dos <i>Primers</i>	23
4.4.4. Reação em Cadeia da Polimerase Convencional – cPCR.....	24
4.4.5 Eletroforese em gel de agarose.....	25
4.4.6 Controles.....	26
4.5 Sequenciamento.....	26
4.6 Análise microbiológica.....	27
4.7 Georreferenciamento.....	27
4.8 Análise estatística.....	27
5. RESULTADOS.....	28
5.1 Extração e quantificação.....	28
5.2 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional – cPCR	28
5.3 Sequenciamento.....	29

5.4 Análises microbiológicas.....	29
5.5 Análise espacial.....	30
5.6 Análise estatística.....	34
6 DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS.....	51
ANEXOS.....	65
ARTIGO CIENTIFICO.....	117

1 INTRODUÇÃO

As doenças de origem alimentar (DTAs) permanecem como uma preocupação de ordem global pois são responsáveis por alto índice de morbimortalidade. Segundo a World Health Organization (WHO), uma em cada dez pessoas em todo o mundo irá adoecer após ingerir alimentos contaminados (WHO, 2022).

As primeiras estimativas publicadas pela World Health Organization em 2015 (WHO, 2015) indicaram a ocorrência de 600 milhões de casos de doenças por ingestão de alimentos não seguros e 420.000 mortes em 2010 em todo o mundo. Na região da Europa a estimativa foi de 23 milhões de pessoas acometidas e 5 mil óbitos decorrentes de DVAs; na região do Sudeste Asiático esse número sobe para 150 milhões de pessoas acometidas e 175 mil óbitos; estes números são provavelmente subestimados devido à falta de dados, pois apenas uma fração dos que adoecem por ingestão de alimentos contaminados procuram atendimento, são tratados e notificados às autoridades de saúde pública (WHO, 2021).

Análises das informações resultantes das atividades de monitoramento apresentadas por Estados-Membros da União Europeia realizada pela Autoridade para a Segurança Alimentar Europeia (*European Food Safety Authority* - EFSA), em 2019 registraram 327.107 casos, 5.175 surtos e 504 óbitos decorrentes de DVAs (EFSA, 2021). Nos Estados Unidos, segundo o *National Outbreak Reporting System* (NORS) do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2022)¹, 9.576 surtos foram registrados entre os anos de 2010 a 2020, resultando em 154.866 pessoas acometidas por DVAs com 261 óbitos. Dentre os patógenos envolvidos nas DVAs, *Listeria monocytogenes* é um dos agentes etiológicos de grande relevância, atraindo grande atenção por ser responsável por altas taxas de internações e óbitos, além de prejuízos econômicos decorrentes dos impactos à saúde com hospitalizações, suspensão da utilização de instalações para manipulação de alimentos e a retirada do

¹ Dados coletados da página <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>, com os seguintes critérios de pesquisa: What types of outbreaks would you like to include: foodborne; Custom range: 2010 to 2020 (CDC, 2022).

produto alimentício do comércio quando a evidência indica ligação entre a doença e determinado alimento (ARCHER et al., 2018).

Dados coletados entre 2010 a 2020 pelo CDC², nos Estados Unidos, citaram *L. monocytogenes* como responsável por 77 surtos, envolvendo 786 pessoas levando 128 a óbito. Apesar da baixa incidência, por estar incriminada em menos de 1% dos surtos ocorridos nos EUA no período relatado, apresenta alta letalidade, sendo responsável por 49% dos óbitos por DVAs registrados no período (CDC, 2022). As evidências epidemiológicas derivadas dos dados de vigilância ativa do CDC, indicaram que esse número pode ser mais elevado, podendo atingir 1600 episódios da doença devido a infecções por *L. monocytogenes* e cerca de 260 óbitos ano (CDC; 2021a).

Segundo Alisson et al (2018), cerca de 99% dos casos de infecções por *L. monocytogenes* são exclusivamente associados a produtos alimentares contaminados. Um estudo realizado por Boone et al. (2021) demonstrou que *L. monocytogenes* foi responsável por 72% das mortes associadas à DVAs registradas pelos estabelecimentos de saúde, entre 2001 e 2019, nos países membros da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE).

Com base nos dados da EFSA de 2021, que avalia a gravidade das doenças de acordo com o número de internações e desfecho dos casos notificados, a listeriose, doença causada pela *L. monocytogenes*, foi a mais grave e letal, apresentando 97,1% de hospitalizações e com 13% de óbitos, uma das maiores taxas associadas a qualquer patógeno de origem alimentar, podendo atingir taxas de mortalidade superiores a 80% (SOUZA et al., 2021). Em quase todos os casos confirmados, houve internação e cerca de um em cada cinco confirmados foram fatais. Devido a esses fatores, *L. monocytogenes* foi incluída na lista de monitoramento compulsório nos países membros da União Europeia (Diretiva 2003/99, Lista A) e na Iniciativa *Listeria*, um programa americano de vigilância do patógeno vinculado ao CDC. (CDC, 2016).

² Dados coletados da página <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>, com os seguintes critérios de pesquisa: What types of outbreaks would you like to include: foodborne; Custom range: 2010 to 2020; Etiology: *Listeria* (CDC, 2022).

L. monocytogenes, acomete vários hospedeiros com quadros entéricos, diarreicos, neurológicos, septicemias e abortos, com altas taxas de mortalidade (BAGATELLA; TAVARES-GOMES; OEVERMANN, 2021).

Em humanos, pacientes imunocomprometidos, mulheres grávidas, crianças, idosos, são especialmente suscetíveis à infecção, sendo potencialmente letal (RADOSHEVICH; COSSART, 2018), o que gera insegurança ao consumidor e desafios à saúde pública em todo o mundo, especialmente após surto de listeriose de origem alimentar em 2018 na África do Sul, categorizado como o maior surto de origem alimentar já registrado da história, com 1.024 casos de listeriose confirmados, com desfecho de 700 internações e 200 óbitos (28,6%) (WHO, 2018).

Sistematicamente os produtos lácteos vêm sendo relacionados em surtos alimentares de listeriose, com taxas altas de envolvimento. De acordo com o *European Rapid Alert System for Food and Feed* - RASFF (EUROPEAN COMMISSION, 2022)³, entre janeiro de 2020 e fevereiro de 2022, foram registradas 240 notificações de alerta sobre a presença de *L. monocytogenes* em alimentos na Europa, das quais 25,83% o leite e seus derivados estavam envolvidos. Segundo estudo de Possas et al. (2022) no RASFF no período de 2016 a 2021, das notificações de alerta relacionadas a presença de patógenos no queijo 82% se referiam à presença de *L. monocytogenes*.

Em 2021, o CDC e a FDA (Food and Drug Administration) investigaram surto relacionado ao consumo de queijo fresco envolvendo 13 pessoas das quais 12 foram hospitalizadas; com dois abortamentos, um parto prematuro e um óbito registrados (CDC, 2021b).

Um dos alimentos com envolvimento recorrentes foram os queijos que, segundo análise da CDC e FDA tem 50 a 160 vezes mais probabilidade de causar infecção quando não produzidos com leite pasteurizado, além do risco de contaminação cruzada durante a industrialização, o que levou essas agências a classificá-los como de alto risco (CDC, 2019). Em 2019, na Europa, 2.621 casos foram confirmados com taxa de letalidade foi de 17,6%. Em 2018 a taxa de

³ Dados coletados da página: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search>, com os seguintes critérios de pesquisa: Date: 09 janeiro de 2020 a 16 fevereiro de 2022; Subject: *Listeria monocytogenes*

letalidade foi de 15,7% e em 2017 de 13,6% o que demonstra o aumento dos casos fatais (MAĆKIW et al., 2021).

O leite é um alimento complexo, com alto valor nutritivo, rico em proteínas, minerais e gorduras e de reconhecida importância nutricional, tanto na sua forma fluida quanto na forma de derivados lácteos (O'CALLAGHAN et al., 2019). Consolidada como uma das principais commodities agropecuárias do mundo, a pecuária leiteira está presente em 98% dos municípios brasileiros, movimentando R\$79 bilhões e ocupa o quarto lugar no ranking do valor bruto da produção, ficando atrás apenas da soja, carne bovina e milho. Em 2020, a produção estimada de leite no Brasil foi de 35,1 bilhões de litros, o que representa incremento 2,8% superior à produção de 2017. Informações referentes à produção inspecionada, tem atingido produção recorde de 25,53 bilhões de litros, representando aumento de 1,5% com relação ao ano anterior (EMBRAPA, 2021). Apesar desse incremento, ainda se faz presente o comércio informal de leite e produtos lácteos sem inspeção sanitária. Estima-se que, no ano de 2019, 9.510 milhões de litros de leite não inspecionados foram comercializados (EMBRAPA, 2020), o que pode ocasionar riscos ao consumidor, uma vez que a fiscalização assegura a oferta de produtos em condições higiênicas sanitárias adequadas e sem riscos à saúde pública.

Segundo dados do IBGE (2017), no Brasil 81,2% dos estabelecimentos produtores de leite bovino são de agricultura familiar, que constituem sua fonte de renda predominantemente através da atividade leiteira em pequenas propriedades rurais, além de atender a demanda alimentar da sociedade, sendo reconhecidamente uma atividade de importância socioeconômica (BRASIL, 2017).

A qualidade higiênica e microbiológica do leite cru corresponde a todas as etapas de obtenção do alimento, desde o processo de ordenha, armazenamento, distribuição e consumo final, e pode ser determinada pelo grau de contaminação por microrganismos, pois servirá como indicador das condições higiênico-sanitárias em que o leite foi obtido e armazenado, considerando todas as etapas (REGUILLO et al., 2018). É de fundamental importância compreender as fontes ambientais de contaminação do leite por microrganismos patogênicos e psicotróficos, para que sejam direcionadas as

melhores práticas de higiene a fim de prevenir a entrada de patógenos em ambientes de produção e possíveis rotas de entrada e, como consequência, contaminação de produtos lácteos (FOX; JIANG; GOBIUS, 2018).

A contaminação do leite cru pode ocorrer durante a ordenha, nos tanques de expansão, água residual de equipamentos, utensílios de ordenha e tetos mal higienizados (RUUSUNEN et al., 2013). Na indústria de laticínios, as principais vias de introdução desses patógenos são o leite cru, os utensílios e os equipamentos contaminados, o solo carregado pelas botas e roupas dos trabalhadores, o ar, o sistema de ventilação, a água empoçada e/ou condensada e os carros de transporte, além da possibilidade de serem carregados por operários ou visitantes doentes. Vale ressaltar que algumas cepas de *L. monocytogenes* possuem capacidade de colonizar e permanecer no ambiente de processamento durante meses ou anos, tornando-se um desafio significativo par controlar e erradicar essa bactéria (FOX; JIANG; GOBIUS, 2018).

Em todo o mundo, observa-se interesse crescente no consumo de leite cru e seus derivados não pasteurizados, partindo dos próprios consumidores a procura ativa por esses produtos, por questões de saúde, características nutricionais e organolépticas mais interessantes como sabor e frescor, (HECKMAN, 2019; BRICK et al., 2020).

Em contrapartida, a associação do consumo de leite cru e de produtos lácteos elaborados sem tratamento térmico ou com medidas de controle inadequados, incluindo surtos de listeriose humana de alto risco de mortalidade (AKRAMI-MOHAJERI et al. 2018), alerta para o perigo potencial desta prática, agravada pela ausência de programas de monitoramento do patógeno no Brasil. A carência de dados epidemiológicos para vincular, identificar e diagnosticar casos da doença a uma fonte provável ou fontes não reconhecidas, mantém a ocorrência de listeriose desconhecida. Analisar este alimento é grande relevância epidemiológica para a saúde pública, pois o leite cru constitui-se em um meio ideal para multiplicação de ampla variedade de bactérias patogênicas (OLIVER; et al. 2009).

Apesar das rigorosas regulamentações de segurança alimentar rigorosas, embora não harmonizadas, nos diferentes países, grandes surtos de listeriose continuam ocorrendo hoje em todo o mundo, com ocorrência crescente relatada

em muitos países, causando impacto negativo notável à saúde pública global (WHO, 2021).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Listeria* spp.: características gerais

O gênero *Listeria* pertence ao filo *Firmacutes*, classe *Bacilli*, ordem *Bacillales*, família *Listeriaceae* e é representado reconhecidamente por 26 espécies e seis subespécies, que podem ser divididas em dois clados distintos: *sensu lato* (*L. grayi* incluindo subsp. *grayi* e *murrayi*, *L. fleischmannii*, incluindo subsp. *fleischmannii* e *coloradonensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. costaricensis*, *L. goaensis*, *L. thailandensis*, *L. valentina*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia*, *L. booriae*, *L. portnoyi* e *L. rustica*) e *sensu stricto* (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* incluindo subsp. *ivanovii* e *londoniensis*, *L. seeligeri*, *L. marthii*, *L. welshimeri*, *L. farber*, *L. immobilis*, *L. cossartiae* subsp. *cossartiae* e subsp. *cayugensis*) (CARLIN et al., 2021). No contexto de saúde pública há um grande interesse no clado *sensu strictu*, pois nele estão compreendidas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*, patogênicas para humanos e animais (ORSI; WIEDMANN, 2009) e (CARLIN et al., 2021).

Morfologicamente, caracterizam-se por pequenos bastonetes gram positivos, de 0,4 a 1,5 µm de largura por 0,5 a 2 µm de comprimento. Apresentam mobilidade (exceto *L. immobilis*) (CARLIN et al., 2021), não são formadores de esporos e são anaeróbicos facultativos (FARBER; PETERKIN, 1991). São ubíquos, devido à sua capacidade de resistirem e multiplicarem em condições desfavoráveis, tais como grandes variações de pH entre 4,3 a 9,6, concentrações salinas e temperaturas entre -1 a 50°C. Encontram-se amplamente difundidas no ambiente, incluindo solo, vegetação, água e alimentos (GANDHI; CHIKINDAS, 2007; NICAOGÁIN; O'BYRNE, 2016).

Entre as diferentes espécies do gênero *Listeria*, apenas as espécies com capacidade hemolítica são patogênicas. *L. monocytogenes* é a espécie potencialmente patogênica para os humanos e animais e, conseqüentemente, a de maior importância para a saúde pública (OLIVEIRA et al., 2020; MAĆKIW et

al., 2021). Outras espécies, como *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, são identificadas apenas esporadicamente em infecções em humanos e animais (BAGATELLA; TAVARES-GOMES; OEVERMANN, 2021).

Por tais características, atreladas à capacidade formadora de biofilme e psicrotrófica, essa bactéria é capaz de colonizar e persistir em ambientes industriais processadores, distribuidores e de armazenamento de alimentos, aderindo-se a grande variedade de superfícies, incluindo vidro, aço inoxidável e poliestireno, conferindo maior resistência a sanitizantes, à remoção por agentes físicos e sua eliminação, representando importante fonte de contaminação de alimentos e possível transmissão do patógeno via alimentar, além de grande fardo para a indústria de alimentos e um desafio para a segurança alimentar (COLAGIORGI et al., 2016). Dessa forma, a ocorrência em alimentos, de qualquer espécie de *Listeria* pode ser utilizado como indicativo de falhas no processo de obtenção da matéria prima e ou etapa de transformação industrial.

De fato, evidências sugerem que equipamentos de processamento de alimentos sejam fonte mais provável de contaminação por *L. monocytogenes* em diferentes tipos de alimentos (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2010; MCCOLLUM et al., 2013) e a presença de biofilmes em instalações e equipamentos é considerado uma das principais fontes de contaminação bacteriana repetida de alimentos (DHAMA et al., 2015).

2.2 *Listeria monocytogenes*: Histórico

L. monocytogenes foi observada pela primeira vez em 1918 por J. Dummont, isolada de caso humano de meningite e de caso de necrose de fígado de coelhos (DISSON; MOURA; LECUIT, 2021). Em 1924, durante necropsia de rotina em seis coelhos que vieram a óbito por morte súbita no laboratório de patologia da Universidade de Cambridge, foi caracterizada como pequenos bacilos gram positivos causadores de leucocitose mononuclear (MURRAY; WEBB; SWANN, 1926). Porém, somente na década de 1980 foi associada como patógeno alimentar em estudo sobre surto no Canadá que identificou sete casos adultos e 34 casos perinatais de listeriose, correlacionando-os com a ingestão de produtos vegetais crus, em especial repolhos adubados com esterco de

ovelhas provenientes de rebanho com histórico da doença, comprovando definitivamente a transmissão do patógeno via alimentar (SCHLECH *et al.*, 1983)

A listeriose é considerada uma das doenças de origem alimentar mais graves devido à alta morbimortalidade (DISSON; MOURA; LECUIT, 2021; BOONE *et al.*, 2022) e os casos habitualmente evoluem para desfechos clínicos graves.

2.3 Epidemiologia dos surtos

Estudos epidemiológicos de surtos em humanos, aprimoramento dos métodos de detecção, sequenciamentos genômicos e elucidação dos determinantes de virulência têm contribuído para a compreensão de *Listeria* e suas vias de infecção (BUCHANAN *et al.*, 2017; MATLE; MBATHA; MADOROBA, 2020).

Eventos recentes de grande escala, como o surto ocorrido na África do Sul em 2018 atraíram atenção sobremaneira devido à sérias implicações econômicas, de saúde pública e ao potencial de disseminação da doença, facilitado pelos processos produtivos e de distribuição de alimentos no mundo (ALLAM *et al.*, 2018).

Os sistemas alimentares mundiais tem se tornado cada vez mais complexos e diversos, assim como a movimentação global de alimentos, (BURIGO; PORTO, 2021) que, atrelados à capacidade de *L. monocytogenes* persistir e se multiplicar em ambientes e temperaturas diversas, facilita a distribuição de produtos contaminados, em especial alimentos prontos para consumo, mesmo que mantidos adequadamente refrigerados.

Além disso, atualmente o consumidor busca por alimentos com uma vida de prateleira maior, minimamente processados e mais naturais, o que restringe as escolhas de métodos de conservação dos processadores de alimentos, o que pode acarretar problemas com bactérias psicrótroficas e patogênicas, como é o caso de *L. monocytogenes* (FORSYTHE, 2010).

Estudos de vigilância epidemiológica demonstram que a listeriose humana é reportada principalmente em países de alta renda que possuem sistema de vigilância ativa, principalmente por não ser uma doença de

notificação obrigatória em alguns países como por exemplo o Brasil (MAĆKIW et al., 2021).

Nos Estados Unidos, entre os anos de 2008 a 2018, apesar de estar relacionada em menos de 1% dos surtos de doenças veiculadas por alimentos, foi responsável por 45,83% das mortes (CDC, 2022).

Na União Europeia, em 2017, 2.480 casos de listeriose humana invasiva foram relatadas em 28 estados e, em 2019, esse número subiu para 2.621 casos, representando menos de 1% de todos os casos de DVAs reportados. Contudo, as taxas de mortalidade foram de 13,8% em 2017, 15,7% em 2018 e 17,6% em 2019 (EFSA; 2021; CDC, 2021), caracterizando-se por aumento de casos letais, com taxas acima de 30% (SMITH et al., 2019; ZHANG et al, 2020).

L. monocytogenes pode ser isolada de várias fontes alimentares cruas ou processadas como leite e derivados, produtos prontos para o consumo a base de carnes, peixes e ovos (MAĆKIW et al., 2021; MAZAHARI et al., 2021)

A ocorrência do patógeno no leite cru é relatada em diversos países, com prevalências variáveis. Estudos de amostras de leite de tanques a granel europeus relataram uma faixa de prevalência de 4,9-6,1% para *L. monocytogenes* (Rea et al., 1992; Fenlon et al., 1995; O'Donnell, 1995; Desmaures et al., 1997; De Reu et al., 2004; Vilar et al., 2007; Ruusunen et al., 2013). Três estudos descrevem uma prevalência mais baixa de 0,4-1,5% (Bachmann e Spahr, 1995; Waak et al., 2002; Botsaris et al., 2016), enquanto um estudo estoniano recente relatou uma prevalência de até 29% para *L. monocytogenes* no leite de tanque a granel de fazendas que distribuem leite cru para máquinas de venda automática (Kalmus et al., 2015). No Brasil, um levantamento bibliográfico mundial muito interessante foi realizado por Lee et al (2019) onde no Brasil apenas 3,7% de prevalência foi detectado.

No Brasil, faltam dados históricos abrangentes de diagnóstico de *L. monocytogenes*. Isso inclui a falta de dados relacionados à prevalência, epidemiologia e descrição de surtos nas bases de dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) (BRASIL; 2021).

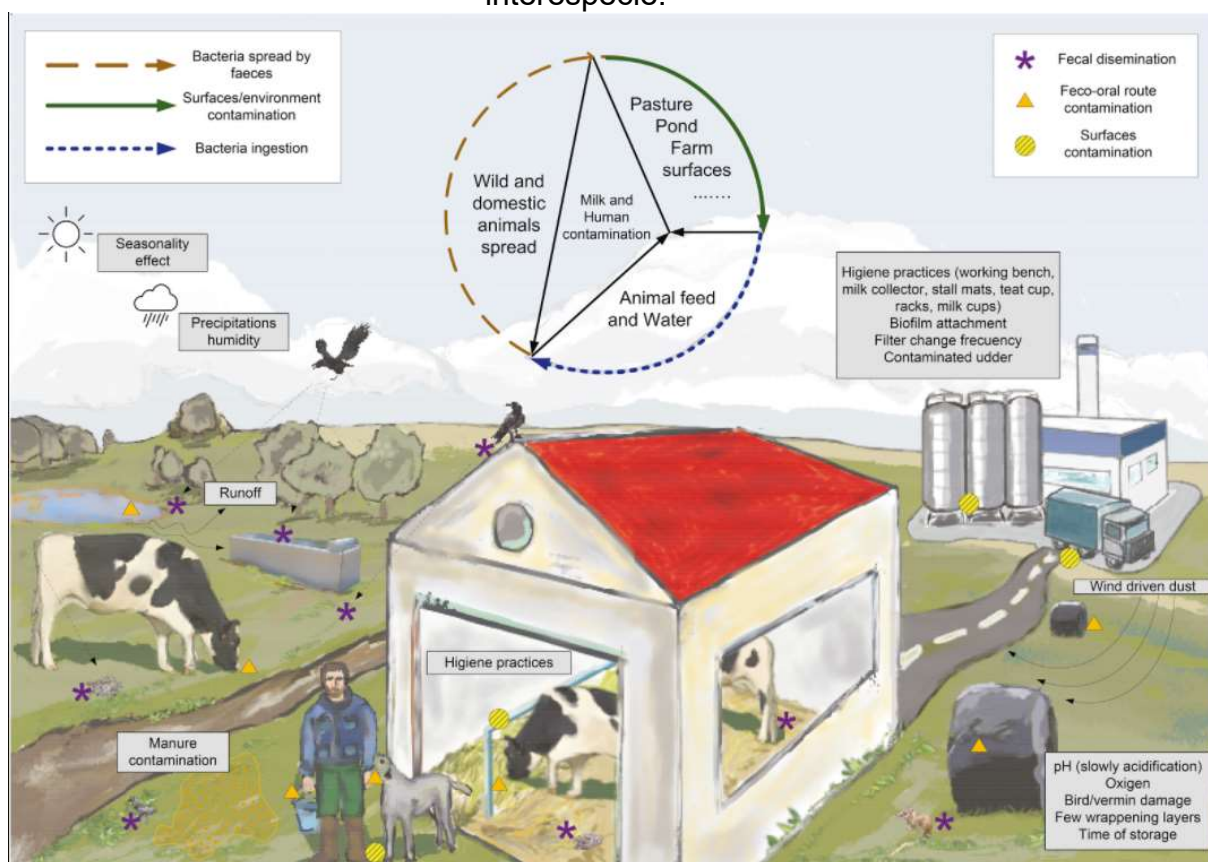
2.4 Fontes de contaminação do leite

L. monocytogenes pode ser encontrada em grande variedade de habitats, incluindo solo, esgoto, água, fezes de animais e vegetação (MAĆKIW et al., 2021). Amostras fecais de ruminantes foram analisadas confirmando a presença do patógeno em 46,3% das amostras de vacas leiteiras, confirmando a eliminação do agente no ambiente por via fecal (MAURY et al., 2019).

Em estudos realizados por Rodriguez et al. (2021) e Castro (2022), foi observada a ocorrência de *L. monocytogenes* de forma ubíqua no meio ambiente das propriedades leiteiras, nos quais currais, celeiro, silagem, feno, fezes de animais silvestres, água e equipamentos de ordenha foram considerados as principais fontes de contaminação do leite, relacionando os padrões de higiene na fazenda e a ocorrência do patógeno (Figura 1).

A perpetuação da bactéria no ambiente ocorre por diversos fatores, uma vez que *L. monocytogenes* pode se multiplicar em diferentes espécies de animais, como cães, aves, pequenos ruminantes e animais silvestres, que podem eliminá-la pelas fezes, contaminando pastos, fontes hídricas, o que torna difícil o controle (BAGATELLA; TAVARES-GOMES; OEVERMANN; 2021).

Figura 1 – Resumo gráfico relativo às interações entre agricultores, animais e meio ambiente, relacionados a eliminação de *L. monocytogenes* e transmissão interespecie.



FONTE: (RODRIGUEZ et al., 2021).

A presença do gênero *Listeria* spp. pode ser indicativo da higiene em todas as etapas de produção de alimentos. Nesse contexto, pode ocorrer contaminação cruzada entre equipamentos e alimentos processados, pois certas cepas de *Listeria* spp. possuem genes que desempenham papel importante na fixação e formação de biofilmes, dando condições da bactéria se fixar e sobreviver em vários tipos de superfície (CASTRO et al., 2018; MAĆKIW et al., 2021; SOUZA et al., 2021).

A presença de *L. monocytogenes* nos úberes dos animais antes da ordenha tem sido descrito como principal fator de risco para a presença no leite (RODRIGUEZ et al., 2021; CASTRO, 2022).

2.5 Patogenia e fatores de virulência

Várias características moleculares de *L. monocytogenes* são determinantes para a sobrevivência do patógeno em condições externas hostis e determinam a sua adaptação como patógeno intracelular (DISSON; MOURA; LECUIT, 2021).

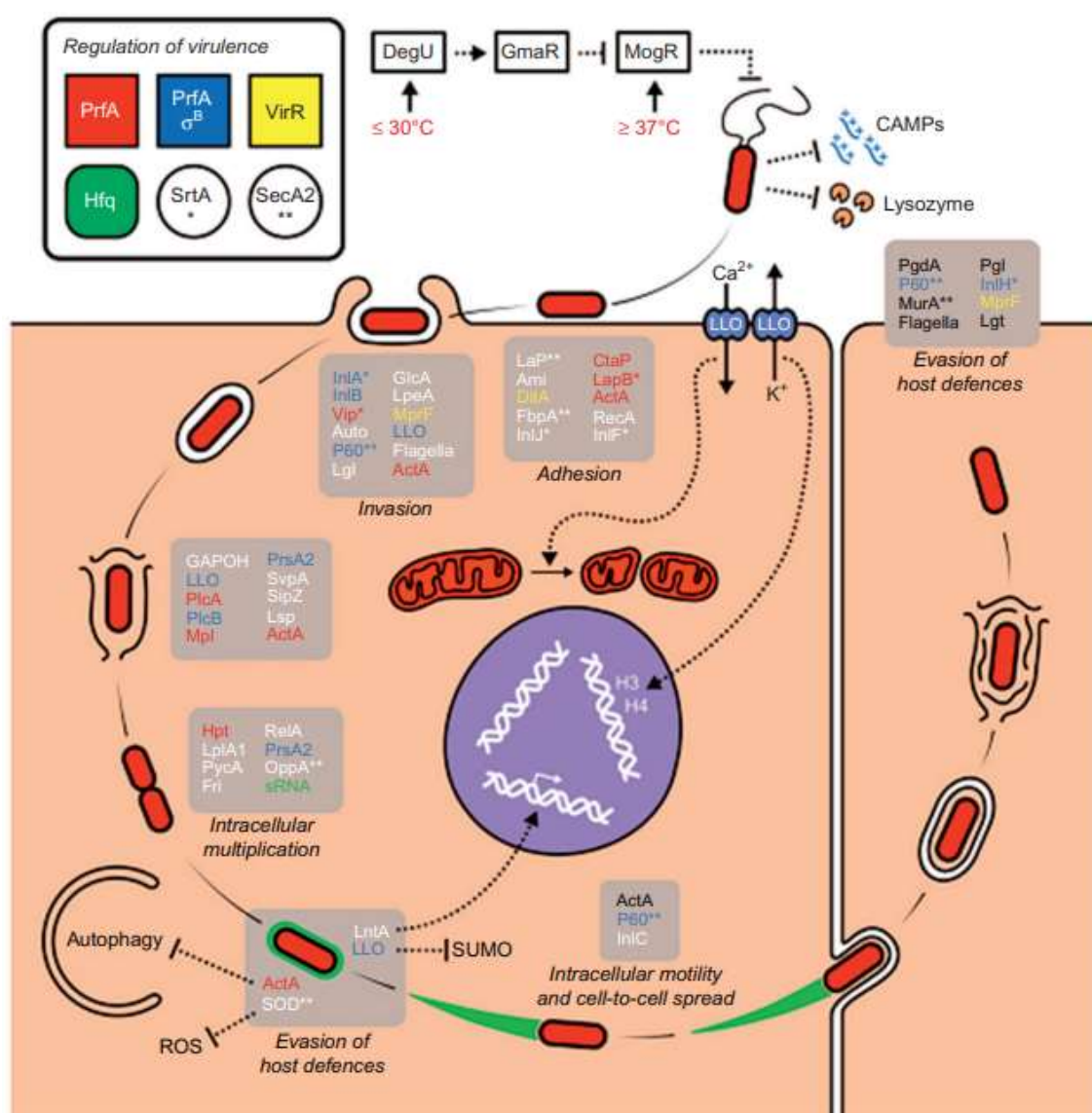
Um dos principais fatores de virulência associado à patogenicidade de *L. monocytogenes* está ligado à listeriolisina O (LLO) (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2006), molécula responsável pela evasão do patógeno das células fagocitárias, supressão da resposta imune e favorecimento da entrada da bactéria por sua capacidade de formação de poros nas células do hospedeiro, codificada pelo gene *hlyA* (*Imo0202*) (DISSON; MOURA; LECUIT, 2021). Após permanência nos vacúolos (independentemente de ter sido absorvido passivamente ou ter entrado ativamente), *L. monocytogenes* move-se para o citoplasma evade dos vacúolos de membrana por vários mecanismos auxiliados pela listeriolisina O (LLO), fundamental para a virulência de *L. monocytogenes*, já que as cepas que abrigam mutação no gene *hlyA* são invariavelmente não patogênicas (COSSART et al., 1989; PORTNOY et al., 1992).

Após a ingestão de alimentos contaminados e período de incubação que pode variar de 1 dia a 3 meses (DHAMA et al., 2015), *L. monocytogenes* adere e entra nas células hospedeiras tanto passivamente, por meio de fagocitose, quanto ativamente, por meio de ações de proteínas de superfície chamadas Internalinas (inl), codificadas por 25 genes diferentes presentes nas ilhas de patogenicidade de *Listeria* (do inglês *Listeria* pathogenicity islands - LIPIs). Por intermédio dessas proteínas, a adesão às células alvo é potencializada, aumentando o poder de invasão do patógeno, que se liga e penetra de forma invasiva nos hepatócitos, fibroblastos e nas células epiteliais do hospedeiro, conferindo a capacidade de atravessar as barreiras do epitélio intestinal, hematoencefálica e feto placentária.

Dentre as internalinas, a Internalina A (*Imo0433*), presente em cepas patogênicas de *L. monocytogenes*, possibilita a formação de junções aderentes com a E-caderina expressa em células epiteliais específicas de humanos, proporcionando que *L. monocytogenes* atravesse a membrana celular, (Figura 2) (WU, 2015; DISSON; MOURA; LECUIT, 2021). A Internalina C interage com

proteínas celulares retardando o sistema imunológico inato e a Internalina J está ligada ao mecanismo de adesão à célula do hospedeiro (DHAMA et al., 2015). Ambas desempenham papéis críticos no estágio pós-intestinal da infecção por *L. monocytogenes*, visto que a deleção dos genes *inlC* (*lmo1786*) ou *inlJ* (*lmo2821*) enfraquece significativamente a patogenicidade de *L. monocytogenes* (SABET et al., 2005; TOLEDO-ARANA et al., 2009; RADOSHEVICH; COSSART, 2018; DISSON; MOURA; LECUIT, 2021).

Figura 2 – Ciclo de infecção celular por *L. monocytogenes* e fatores de virulência envolvidos nas etapas.



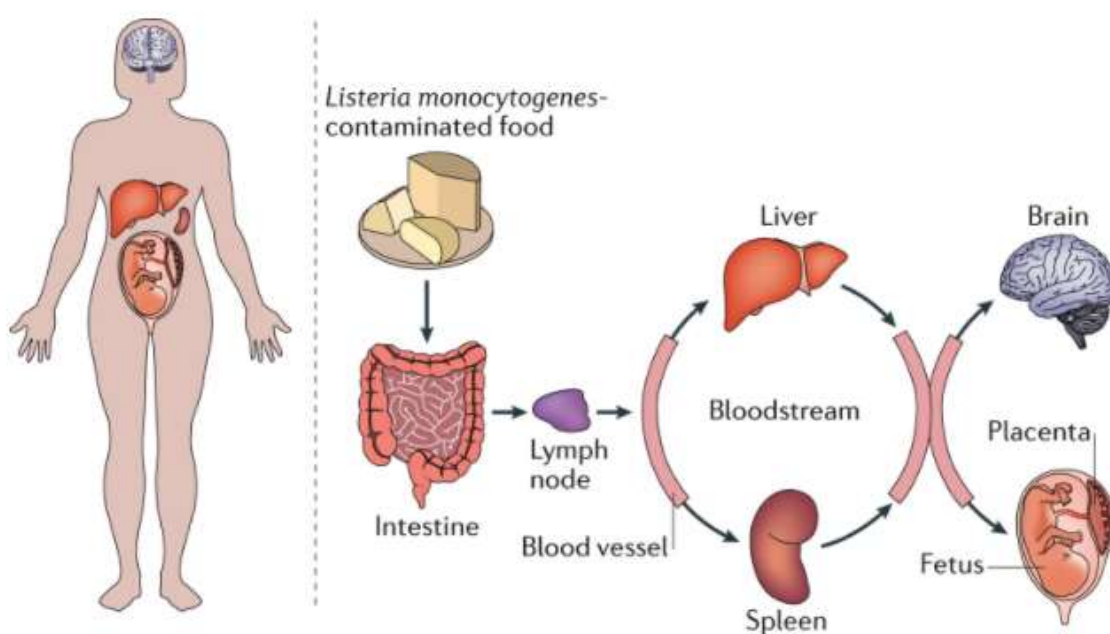
FONTE: (WU, 2015).

2.6 A doença em humanos

Duas formas de manifestação clínica da listeriose são conhecidas: uma forma não invasiva, em indivíduos imunocompetentes, a qual se desenvolve como gastroenterite febril; e uma forma invasiva que, em hospedeiros imunocomprometidos, como idosos e pacientes em terapia imunossupressora, pode se manifestar como septicemia, peritonite e meningoencefalite, uma vez que os macrófagos fagocitam o patógeno que se multiplica e se dissemina pelo organismo do hospedeiro (DHAMA et al., 2015). A listeriose invasiva é responsável por mais de 90% das internações com 20% a 30% de letalidade, sendo classificada como uma das doenças transmitidas por alimentos mais graves (MATLE; MBATHA; MADOROBA, 2020).

Em geral, *L. monocytogenes* infecta o hospedeiro humano por via oral pelo consumo de produtos alimentares contaminados sendo que apenas 500 células de *Listeria monocytogenes* são suficientes para gerar natimortos em grávidas (FORSYTHE, 2010). O patógeno é capaz de atravessar três barreiras fisiológicas: intestinal, hematoencefálica e as barreiras placentárias do feto (Figura 3). Desta forma, os sinais clínicos em gestantes incluem abortamentos, parto prematuro, sepse neonatal, entre outros (RADOSHEVICH; COSSART, 2018).

Figura 3 – Visão geral de infecção por *L. monocytogenes*.



FONTE: (RADOSHEVICH; COSSART, 2018).

2.7. Justificativa

A detecção de cepas de *L. monocytogenes* é importante para a determinação da presença do microrganismo no leite para avaliar o risco do consumo e utilização do leite cru à saúde pública (Castro et al., 2018), especialmente com o aumento da demanda por leite cru (HECKMAN, 2019; BRICK et al., 2020) e alimentos prontos para o consumo (LEONG et al., 2017; MAĆKIW et al., 2021).

Detectar e controlar a presença e disseminação de cepas de *L. monocytogenes* em plantas processadoras de alimento é um desafio e faz parte de diversos programas de saúde pública, como nos Estados Unidos e países membros da União Européia, que têm como meta a redução de casos de listeriose e com consequência maior oferta de produtos seguros para o consumo (WHO, 2022; EFSA, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

O presente estudo pesquisou a frequência de ocorrência de DNA de *L. monocytogenes* em leite cru bovino procedente de tanques de resfriamento de pequenas propriedades leiteiras de característica de agricultura familiar.

3.2 Específicos

- a) Utilizar a técnica molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional para detecção de material genético de *L. monocytogenes* em amostras de leite bovino a partir de tanques de expansão;
- b) Detectar a presença dos genes de virulência de *L. monocytogenes*;
- c) Realizar o sequenciamento Sanger dos isolados positivos;
- d) Realizar o isolamento microbiológico de *Listeria monocytogenes* a partir de amostras positivas às provas moleculares para mais de um gene;
- e) Analisar espacialmente a distribuição das propriedades leiteiras com casos positivos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética

Tendo em vista a situação pandêmica por COVID-19, não foi possível a coleta presencial de material nas propriedades leiteiras devido às medidas de isolamento e ao controle sanitário de proteção à saúde pública. Desta forma, o presente projeto utilizou material biológico (leite de tanque de expansão) de projeto de pesquisa já concluído e publicado, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética - CEUA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – UNESP sob número 51/2016; ressubmetido e aprovado pelo Comitê de Ética-CEUA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – UNESP sob número 18/2021 (ANEXO 1).

Destaca-se que todas as amostras de leite utilizadas estavam devidamente armazenadas em freezer com temperatura inferior a -18°C no laboratório e não houve qualquer prejuízo para a execução da técnica molecular de PCR proposta para o diagnóstico de *L. monocytogenes*, sendo atendidos adequadamente todos os protocolos descritos na literatura para esta pesquisa.

4.2 Local de realização dos exames

O procedimento molecular de Reação em Cadeia da Polimerase – PCR foi realizado no Laboratório de Sanidade Animal da Unidade Regional de Pesquisa e Desenvolvimento - APTA/SAA – SP (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios), situada na cidade de Bauru - SP. As reações de sequenciamento foram realizadas em laboratório particular no município de Botucatu-SP.

As análises microbiológicas (cultura para isolamento) de *L. monocytogenes* foram realizadas junto ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZ-UNESP), Campus de Botucatu-SP, gentilmente em colaboração do Prof. Dr. Juliano Gonçalves Pereira.

4.3 Amostras de leite bovino a partir de tanques de expansão

As amostras de leite foram procedentes de 102 tanques de expansão, de diferentes propriedades localizadas em oito diferentes municípios da região Centro-Oeste Paulista, sendo uma amostra de leite por propriedade: Avaré (47 amostras: nº 1 a 47), Cerqueira Cesar (dez amostras: nº 48 à 57), Arandu (quatro amostras: nº 58 à 61), Bofete (sete amostras: nº 62 à 68), Pardinho (16 amostras: nº 69 à 84), Anhembi (13 amostras: nº 85 à 97), Botucatu (duas amostras: nº 98 e 99) e Bauru (três amostras: nº 100 à 102).

Todas as amostras de leite estavam devidamente armazenadas desde 20126 no Laboratório de Sanidade Animal da APTA Centro-Oeste – Bauru. O leite dos tanques de expansão foram coletados para processamento em laticínio da região estudada. (Figura 4).

Figura 4: “A”, “B” e “C” amostras devidamente armazenadas, separadas e identificadas no laboratório. “D” amostras sendo aliqüotadas em microtubos estéreis de 1,5mL, dentro da capela de fluxo laminar previamente esterilizada por 15 minutos sob luz UV, para serem submetidas à extração de DNA.



FONTE: arquivo pessoal.

As amostras de leite foram provenientes de coletas diretas dos tanques de expansão individuais que estavam com a temperatura máxima de 4°C, e não armazenavam leite de ordenhas realizadas a mais de 48 horas. Previamente à coleta, o agitador do tanque foi ligado para que o leite fosse homogeneizado por pelo menos 5 minutos e, após este período, com auxílio de concha de inox previamente esterilizada, foi coletado 250 mL de leite cru para um frasco plástico estéril, o qual foi acondicionado em caixa isotérmica contendo gelo reciclável e, em seguida, encaminhado ao laboratório para os procedimentos metodológicos.

4.4 Exames moleculares

4.4.1 Extração de DNA do leite para pesquisa de *L. monocytogenes*

A extração de DNA das amostras de leite foi realizada com Kit comercial Illustra Blood GenomicPrep (GE Healthcare®), de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante e modificações de Cunha et al. (2006) (ANEXO 2).

4.4.2 Quantificação do DNA

A verificação da quantidade e concentração de ácido nucleico extraído de cada amostra foi determinada por espectrofotometria, utilizando-se o Quantificador NanoVue Plus™ da GE Healthcare, Bioscience/UK, usando os valores obtidos da relação A260/280, segundo Desjardins; Conklin (2010) (ANEXO 3).

Todas as amostras de DNA foram mantidas congeladas em temperatura inferior a -18°C até o momento da utilização para a reação de PCR.

4.4.3 Seleção dos *primers*

Os *primers* foram selecionados com base na especificidade, sendo submetidos ao *GenBank* por meio da opção BLAST® e Primer-BLAST® do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados foram:

- a) PRS(f/r), selecionado com o objetivo de reconhecimento da espécie pela da pesquisa do gene *prs* (*phosphoribosyl pyrophosphate synthetase*), comum ao gênero *Listeria* spp., de acordo com Doumith et al. (2004).
- b) LM1/LM2 (BORDER et al., 1990) foi selecionado com o objetivo pesquisar o gene *hlyA* (*Imo0202*), que codifica a listeriolisina O, um dos principais fatores de virulência relacionado a adesão, invasão, escape dos vacúolos primários e supressão da resposta imune do hospedeiro (LIU et al., 2017; WU, 2015).
- c) *inlA*, *inlC* e *inlJ*, genes que codificam *internalinas* responsáveis pela internalização, com o objetivo de determinar a virulência da cepa, de acordo com Liu et al. (2007).

Os genes alvo, a sequência dos *primers* e o produto de amplificação estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Genes, produto da amplificação e descrição dos *primers* PRS(f/r), LM1/LM2, *inlA*, *inlC* e *inlJ*, utilizados no diagnóstico de *L. monocytogenes*.

Gene	Sequências de iniciadores (5' → 3')	Produto de PCR esperado (pb)
<i>prs</i>	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	370
	CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	
<i>hlyA</i>	CCTAAGACGCCAATCGAA	702
	AAGCGCTTGCAACTGCTC	
<i>inlAs</i>	ACGAGTAACGGGACAAATGC	800
	CCCGACAGTGGTGCTAGATT	
<i>inlC</i>	AATTCCCACAGGACACAACC	517
	CGGGAATGCAATTTTTCTACTA	
<i>inlJ</i>	TGTAACCCCGCTTACACAGTT	238
	AGCGGCTTGGCAGTCTAATA	

FONTE: (BORDER et al., 1990; DOUMITH et al., 2004; LIU et al., 2007).

4.4.4. Reação em Cadeia da Polimerase Convencional – cPCR

Para as reações de PCR dos oligonucleotídeos *PRS(f/r)* e *LM1/LM2* foram utilizados tubos de reação de 0,2 mL individuais para cada amostra, que recebeu tampão de PCR (50 mM KCl, 20 mM de Tris-HCl), 1,6 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1 µL de Taq-Polimerase (Platinum Taq DNA Polimerase, Invitrogen®), 0,2 uM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 1 µL da amostra testada e 8,3 µL de água ultrapura (MIX-PCR). Desta forma, cada tubo apresentou o total de 12 µL (11 µL MIX-PCR e 1 µL do produto de extração do DNA da amostra testada).

Para as reações de PCR dos oligonucleotídeos *inlA*, *inlC* e *inlJ* foram utilizados tubos de reação de 0,2 mL individuais para cada amostra que recebeu tampão de PCR (50 mM KCl, 20 mM de Tris-HCl), 0,75 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dNTPs, 0,5 µL de Taq-polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 0,5 µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 2 µL da amostra testada

e 17,5 µL de água ultrapura (MIX-PCR). Desta forma, cada tubo apresentou o total de 25 µL (23 µL do MIX-PCR e 2 µL do produto de extração do DNA da amostra testada).

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Mastercycler Pro gradiente (Eppendorf®). Para o *primer PRS(f/r)*, *inlC* e *inlJ* as reações foram baseadas no protocolo descrito por DOUMITH et al. (2004); para o *primer LM1/LM2* o protocolo foi baseado em Aznar e Alarcón (2003) e para o *primer inlA* baseado em Liu et al. (2007), de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2: Condições da PCR

<i>Primer</i>	Condições da PCR	Referência
PRS(f/r)	Desnaturação por 3 minutos a 94°C, anelamento com 35 ciclos de 0,40 minutos a 94°C, 1,15 minutos a 53°C e 1,15 minutos a 72°C. Ciclo de extensão por 7 minutos a 72°C.	(DOUMITH et al.; 2004)
LM1/LM2	Desnaturação por 5 minutos a 94°C, anelamento com 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 50°C e 45 segundos a 72°C. Ciclo de extensão final por 5 minutos a 72°C	(AZNAR; ALARCÓN, 2003)
inlA	Desnaturação por 2 minutos a 94°C, anelamento com 30 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 55°C e 50 segundos a 72°C. Ciclo de extensão final por 2 minutos a 72°C	(LIU et al.; 2007).
inlC	Desnaturação por 3 minutos a 94°C, anelamento com 35 ciclos de 0,40 minutos a 94°C, 1,15 minutos a 53°C e 1,15 minutos a 72°C. Ciclo de extensão por 7 minutos a 72°C.	(DOUMITH et al.; 2004)
inlJ		

4.4.5 Eletroforese em gel de agarose

Alíquotas de 10 µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 2 µL de tampão de corrida (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol,

30% glicerol, 70% água ultrapura) e submetidas à eletroforese em cuba horizontal contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09M de ácido bórico e 0,001M de EDTA). A identificação dos produtos amplificados foi realizada em eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Syber Safe® (Invitrogen) 0,1 µL/mL. A voltagem utilizada foi de 100V por 90 minutos (1h30min) para os *primers* PRS(f/r) e LM1/LM2 e por 70 minutos (1h10min) para os *primers* inIA, inIC e inIJ. Para o padrão de peso molecular, foi utilizado o LowRanger 100 bp DNA Ladder (Norgen) e o tamanho dos fragmentos amplificados, foram comparados visualmente com os padrões de peso molecular das cepas padrão utilizadas como controles positivos com o uso de luz UV e a imagem capturada pelo sistema Major Science™, a qual foi documentada utilizando-se o software Vision Works LS.

4.4.6 Controles

Como controles positivos foi utilizada cepa de *L. monocytogenes* ATCC 7644, cedida pelo Laboratório de Inspeção Sanitária de Alimentos (SOAP) da FMVZ – UNESP – Botucatu e DNA extraído de *L. monocytogenes* ATCC 19117 cedido pelo Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – UEL – Londrina - PR. Água ultrapura estéril foi o controle negativo.

CRITERIO DE POSITIVIDADE

4.5 Sequenciamento

O produto da cPCR foi purificado com a enzima ExoSap (USB) e utilizado 4 µL da enzima para cada 10 µL de produto da PCR, incubando-se inicialmente durante 1 hora a 37 °C e depois por 20 minutos a 80 °C, e posteriormente quantificado em espectrofotômetro. Foram selecionadas as amostras cujo produtos da PCR amplificaram fortemente.

Os amplicons foram visualizados, pelo software Chromas 2.3, na forma de eletroferograma alinhados pelo programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 10.0 (KUMAR et al., 2018). Posteriormente, submetidos ao BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e comparados com as sequências depositadas nos bancos de dados.

4.6 Análise microbiológica

O método de cultura para isolamento de *L. monocytogenes* de amostras de leite com a finalidade de avaliar as características fenotípicas das colônias e a viabilidade da bactéria foi realizado de acordo com o método MFHBP-30, segundo Pagotto et al. (2001) (ANEXO 7). Em resumo, para 10 mL da amostra, foram adicionados 90 mL de caldo de Listeria Enrichment Broth (LEB) (base de enriquecimento para *Listeria*), e incubados a 30 °C durante 48 h. Decorrido este período, 0,1 mL do LEB cultivado foi transferido para um frasco contendo 10 mL de caldo Fraser Listeria Selective Enrichment Broth, e incubado a 35 °C por 48 h. Nessa etapa já é possível verificar a presença ou não do gênero e, caso haja suspeita de amostra positiva (alteração da coloração do meio Fraser) a mesma será submetida à etapa de semeadura em placas contendo ágar Palcam e ágar Oxford, incubando os mesmos a 35 °C por 24 a 48 horas.

Foram submetidas à essa etapa amostras positivas para mais de um *primer*: amostras 23, 24, 25, 88 e 89, positivas para os *primers* PRS e inIJ. A PCR com o *primer* inIC foi realizada em etapa posterior às análises microbiológicas e por esse motivo não foram testadas.

4.7 Análise espacial

Utilizando base de dados digital, o geoprocessamento foi realizado a partir do mapeamento das amostras positivas, visando compreender espacialmente a distribuição dos casos positivos na área de estudo. Para isso, utilizou-se o instrumento de Sistema de Informação Geográfica (SIG), com o software QGis 3.24.1

4.8 Análise estatística

Para comparação das proporções de positividade foi utilizado o teste Exato de Fisher e quando os resultados foram significativos ($p < 0,05$), foi utilizado o teste de comparações múltiplas de proporções segundo ZAR (ZAR, 2010).

Foram consideradas positivas as amostras onde houve detecção de DNA por pelo menos um *primer*.

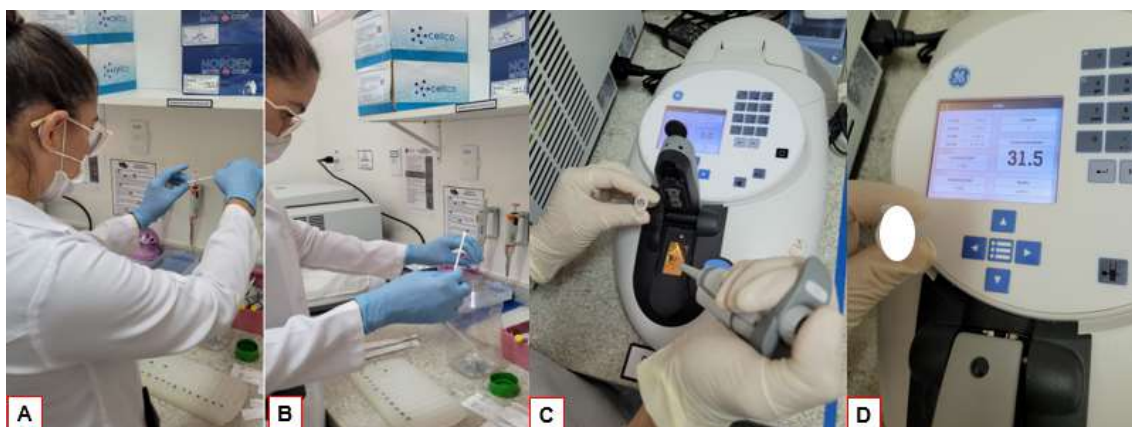
5. RESULTADOS

5.1 Extração e quantificação

O DNA das 102 amostras de leite foi extraído (Figura 5) e quantificado (ANEXO 3) com o auxílio do quantificador NanoVue Plus® da GE Healthcare, Bioscience/UK®.

A relação 260/280, por estar entre 1.800 e 2.000, indica a confiabilidade no processo de extração do DNA das amostras de leite, evidenciando pouca ou nenhuma interferência de inibidores. A quantidade de DNA encontrada em cada amostra quantificada foi considerada satisfatória para dar seguimento às etapas da biologia molecular.

Figura 5: “A” e “B”: amostras de leite submetidas a extração do DNA; “C” e “D”: quantificação das amostras extraídas.



FONTE: arquivo pessoal.

5.2 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional – cPCR

Das 102 amostras testadas, 55 foram positivas para pelo menos um primer (apêndice 1).

Inicialmente, foi utilizado o *primer* PRS(f/r), com o intuito de detectar todas as espécies do gênero *Listeria* spp. Como resultado, 21 amostras (20,59%) foram positivas à cPCR (ANEXO 4)

Para detectar os genes de virulência foram utilizados os *primers* descritos na Tabela 1, tendo como resultado 23 amostras (22,55%) positivas com o *primer* inlJ (Figuras 11 a 15) e 22 amostras (21,57%) positivas com o *primer* inlC

(ANEXO 4). Não houve amplificação com os primers inIA e LM1/LM2.

5.3 Sequenciamento

Os amplicons foram submetidos ao BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e comparados com as sequências depositadas nos bancos de dados (ANEXO 5). Posteriormente foram visualizados, pelo software Chromas 2.3, na forma de eletroferograma (ANEXO 6) e alinhados pelo programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 10.0 (KUMAR et al., 2018).

Para o *primer* inIJ, foram selecionadas nove e uma amostras, cujos produtos da PCR amplificaram mais fortemente para a realização do sequenciamento. Como resultado das amostras positivas ao gene *inIJ*, as amostras 07, 22, 26, 36, 44, 45, 86, 88 e 90 obtiveram 100% de similaridade à *L. monocytogenes* (chave de acesso: CP054846.1). como podemos verificar nos resultados do BLAST conforme (ANEXO 5).

Para o *primer* inIC, a amostra 91 foi selecionada pois o produto da PCR amplificou fortemente e ainda não havia sido sequenciada nos resultados com os *primers* anteriores para a realização do sequenciamento.

Para o *primer* PRS(f/r), das 102 amostras de leite, 21 foram positivas, porém não foi possível obter os resultados do sequenciamento genético, possivelmente devido à baixa concentração de DNA.

5.4 Análises microbiológicas

As amostras positivas às provas moleculares para os *primers* PRS e inIJ foram submetidas ao cultivo microbiológico de *L. monocytogenes* de amostras de leite com a finalidade de avaliar as características fenotípicas das colônias e a viabilidade da bactéria. As amostras 23, 24, 25, 87, 88, 89 foram devidamente acondicionadas em tríplex embalagem (frascos individuais contendo as amostras e lacrados, embalagem secundária, contendo os frascos e caixa de isopor para manutenção da temperatura) juntamente com gelo reciclável, enviadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Serviço de Orientação à Alimentação Pública (SOAP) do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade

Estadual Paulista (UNESP) no Campus de Botucatu, onde as análises microbiológicas foram realizadas de acordo com o método MFHBP-30, segundo Pagotto et al. (2001) com adequações. Em resumo, para 10 mL da amostra, foram adicionados 90 mL de caldo de Listeria Enrichment Broth® (LEB) (base de enriquecimento para *Listeria*), e incubados a 30 °C durante 48 h. Decorrido este período, 0,1 mL do LEB cultivado foi transferido para um frasco contendo 10 mL de caldo Fraser Listeria Selective Enrichment Broth®, e incubado a 35°C por 48 h. Nessa etapa já é possível verificar a presença ou não do gênero e, caso haja suspeita de amostra positiva (alteração da coloração do meio Fraser). Como já nesta etapa não houve crescimento de *L. monocytogenes*, não deu-se andamento nas etapas posteriores das análises microbiológicas.

5.5 Análise espacial

Foi realizada análise espacial dos municípios das propriedades leiteiras avaliadas e que foi possível detectar DNA de *L. monocytogenes* no leite do tanque, verificando-se a positividade em todos os municípios, com exceção de Bauru, sendo esses Avaré, Cerqueira Cesar, Arandu, Bofete, Pardinho, Anhembi e Botucatu.

Os mapas com as localizações geográficas estão apresentadas a seguir.

Figura 6: Mapa do Brasil. Qgis.

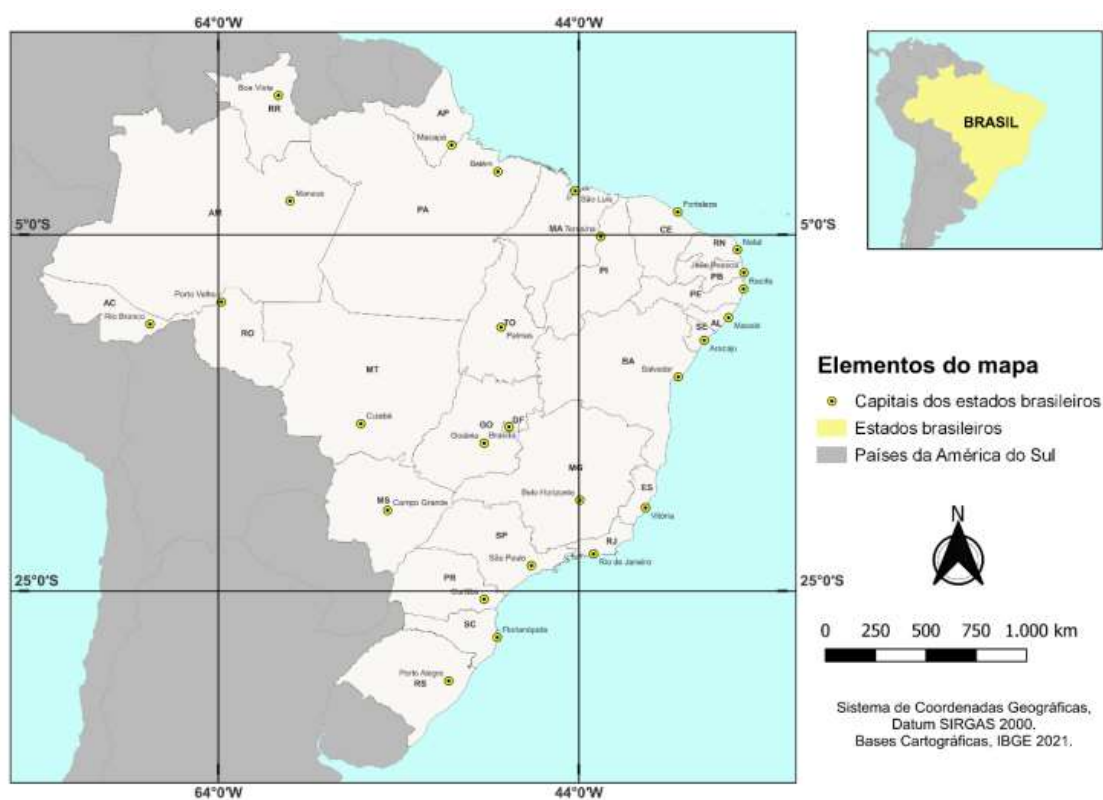


Figura 7: Mapa do Estado de São Paulo, Brasil. Qgis.

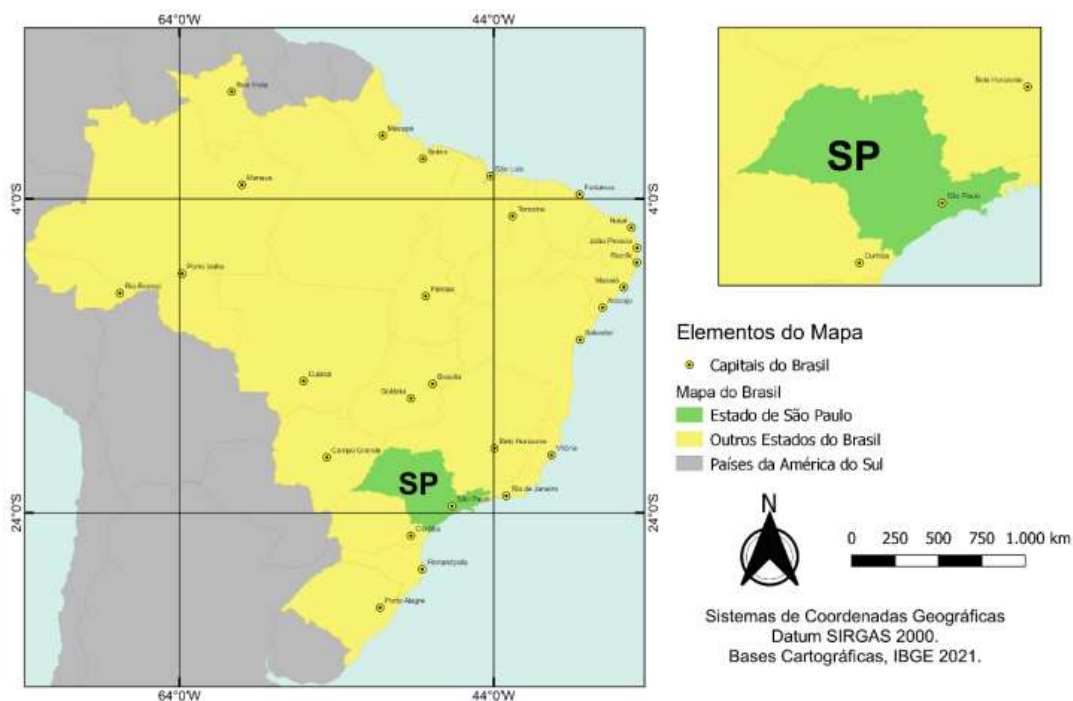


Figura 8: Municípios com amostras de leite bovino positivas para *L. monocytogenes*.

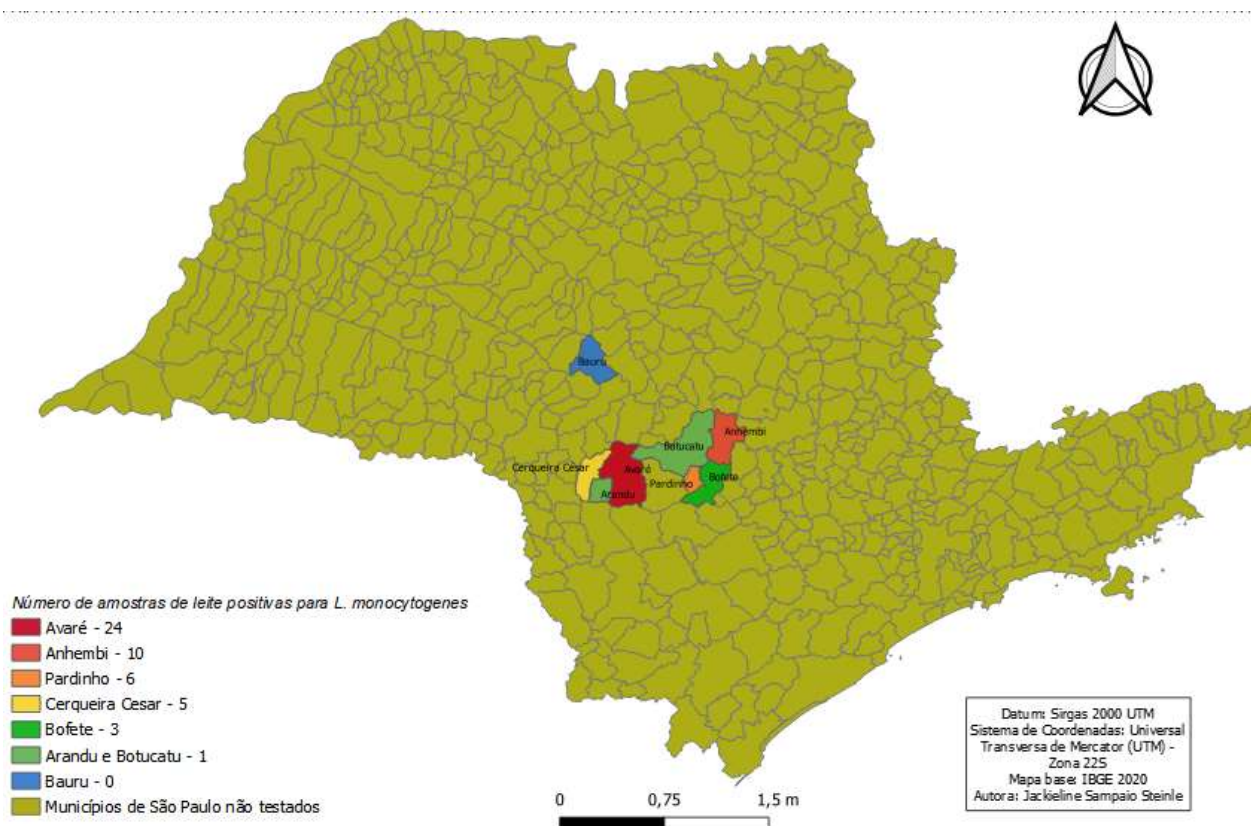


Figura 9: Municípios com amostras de leite bovino positivas para o *primer* PRS.

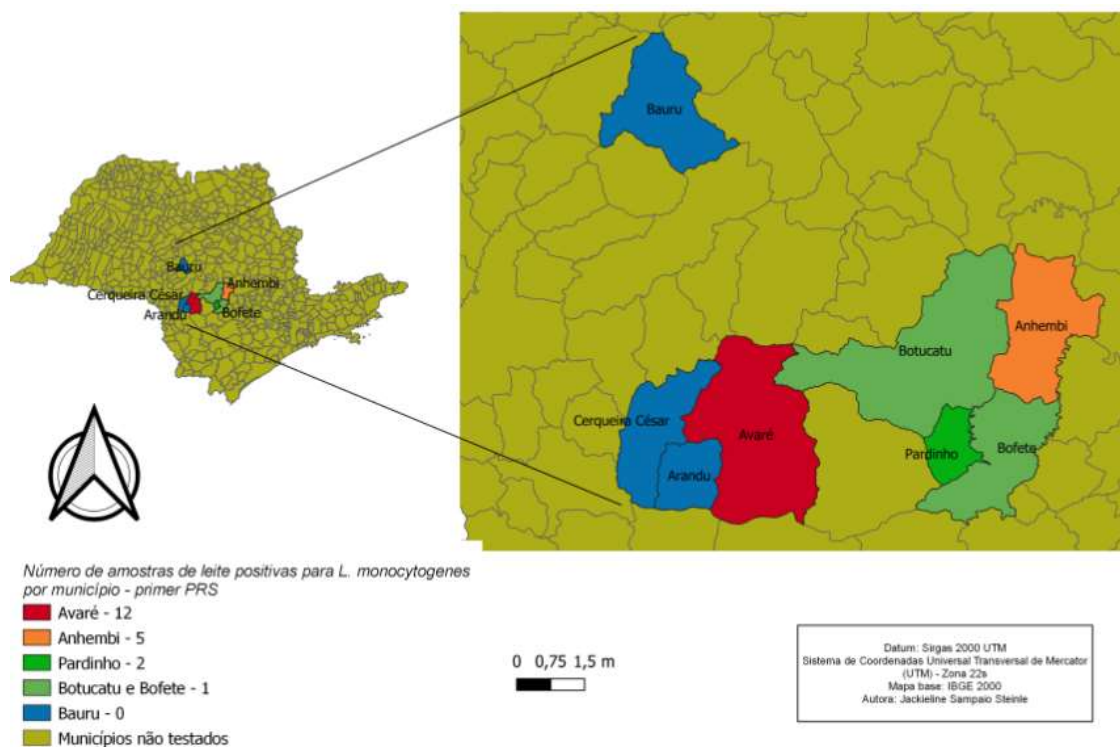


Figura 10: Municípios com amostras de leite bovino positivas para o *primer* inIJ.

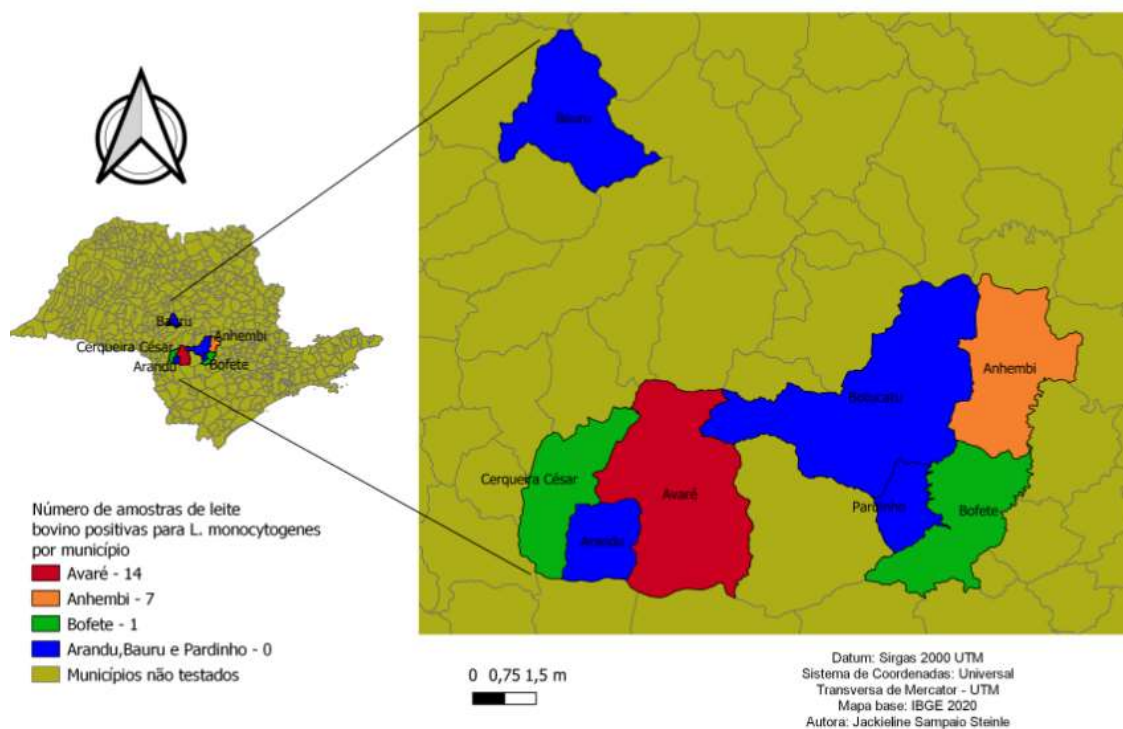
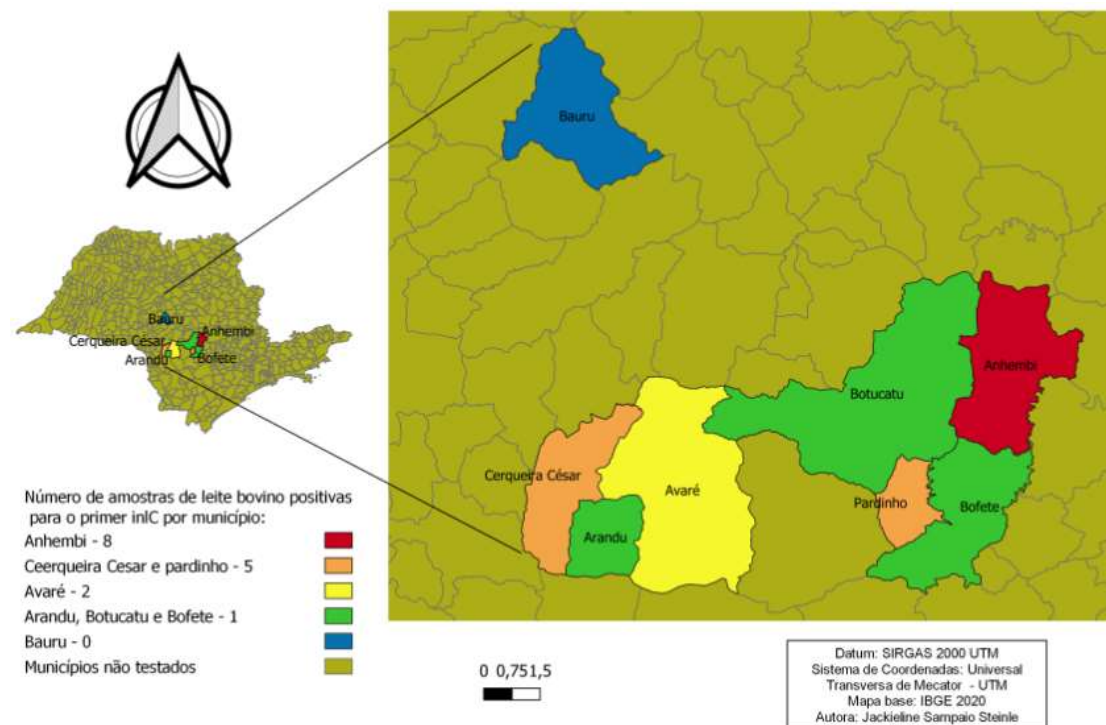


Figura 11: Municípios com amostras de leite bovino positivas para o *primer* inIC.



5.6 Análise estatística

Na análise estatística pudemos observar que 50 amostras de leite (49%) foram positivas para pelo menos um (01) *primer*, ou seja, em quase metade das amostras de leite havia a presença de DNA de *L. monocytogenes*.

O *primer* mais frequente foi o inIJ, com 23 amostras positivas (22,55%), seguido do *primer* inIC, com 22 amostras positivas (21,57%) e finalmente o *primer* PRS, com 21 amostras positivas (20,59%). Não houve amplificação de amostras utilizando os *primers* inIA e LM1/LM2.

Dos municípios pesquisados, a maior prevalência foi encontrada em Anhembi, onde 76,92% das amostras amplificaram para pelo menos um *primer*, seguido de Avaré com 51% de amostras positivas, Cerqueira Cesar e Botucatu com 50%, Bofete com 42,85%, Pardinho com 37,50% e Arandu com 25%. As amostras coletadas em Bauru não testaram positivo.

Doze (12) amostras de leite amplificaram para mais de um *primer*, das quais seis (50%) eram provenientes do Município de Anhembi, quatro (33%) eram originárias de Avaré, uma de Cerqueira Cesar e uma de Pardinho.

As amostras 88 e 96 amplificaram para três *primers* (PRS, inIC e inIJ), ambas oriundas de Pardinho.

Para as análises estatísticas verificando-se a distribuição de amostras positivas por município, utilizou-se o teste Exato de Fisher onde não foi constatada diferença estatística entre as proporções de positividade (tabela 1).

Tabela 03 - Distribuição de frequências das amostras segundo local e positividade.

Amostras	Local								Total
	Anhembi	Arandu	Avaré	Bauru	Bofete	Botucatu	Cerq. César	Pardinho	
Negativas	3	3	23	3	4	1	5	11	53
	23,1	75,0	48,9	100,0	57,1	50,0	50,0	68,7	52,0
Positivas	10	1	24	-	3	1	5	5	49
	76,9	25,0	51,1	0,0	42,9	50,0	50,0	31,2	48,0
Total	13	4	47	3	7	2	10	16	102
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

P=0,17 - Teste Exato de Fisher

Não houve diferença entre as proporções de positividade.

Tabela 04 - Distribuição de frequências das amostras segundo primer e positividade.

Amostras	Primer					Total
	INLA	INLC	INLJ	LM1/LM2	PRS	
Negativas	102	80	79	102	81	444
	100,0	78,4	77,4	100,0	79,4	87,1
Positivas	-	22	23	-	21	66
	0,0b	21,6a	22,6a	0,0b	20,6a	12,9
Total	102	102	102	102	102	510
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

$P < 0,0001$ - Teste Exato de Fisher seguido do teste de comparações múltiplas de proporções segundo ZAR.

Percentuais seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente.

Os percentuais de INLC, INLJ e PRS não diferiram estatisticamente, mas diferiram do INLA e do LM1/LM2

Tabela 05 - Distribuição de frequências das amostras segundo local e positividade.

Amostras	Local								Total
	Anhembi	Arandu	Avaré	Bauru	Bofete	Botucatu	Cerq. César	Pardinho	
Negativas	45	19	207	15	32	9	44	73	444
	69,2	95,0	88,1	100,0	91,4	90,0	88,0	91,2	87,1
Positivas	20	1	28	-	3	1	6	7	66
	30,8a	5,0b	11,9ab	0,0b	8,6b	10,0ab	12,0ab	8,8b	12,9
Total	65	20	235	15	35	10	50	80	510
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

$P < 0,0001$ - Teste Exato de Fisher seguido do teste de comparações múltiplas de proporções segundo ZAR.

Proporções seguidas de pelo menos 1 letra em comum não diferem estatisticamente

Anhembi diferiu de Arandu, Bauru, Bofete e Pardinho. Mas não diferiu dos demais locais. E os outros locais não diferiram entre si.

Tabela 06 - Distribuição de frequências das amostras segundo primer e positividade no Município de Anhembi.

Amostras	Primer					Total
	INLA	INLC	INLJ	LM1/LM2	PRS	
Negativas	13	5	6	13	8	45
	100,0	38,5	46,2	100,0	61,5	87,1
Positivas	-	8	7	-	5	20
	0,0b	61,5a	53,8a	0,0b	38,5a	12,9
Total	13	13	13	13	13	65
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

P<0,0001 - Teste Exato de Fisher seguido do teste de comparações múltiplas de proporções segundo ZAR.

Percentuais seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente.

Os percentuais de INLC, INLJ e PRS não diferiram estatisticamente, mas diferiram do INLA e do LM1/LM2.

Tabela 07 - Distribuição de frequências das amostras segundo primer e positividade no Município de Arandu.

Amostras	Primer					Total
	INLA	INLC	INLJ	LM1/LM2	PRS	
Negativas	4	3	4	4	4	19
	100,0	75,0	100,0	100,0	100,0	95,0
Positivas	-	1	-	-	-	1
	0,0	25,0	0,0	0,0	0,0	5,0
Total	4	4	4	4	4	20
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

P=0,99 - Teste Exato de Fisher.

Não houve diferença entre as proporções.

Tabela 08 - Distribuição de frequências das amostras segundo primer e positividade no Município de Avaré.

Amostras	Primer					Total
	INLA	INLC	INLJ	LM1/LM2	PRS	
Negativas	47	45	33	47	35	207
	100,0	95,7	70,2	100,0	74,5	88,1
Positivas	-	2	14	-	12	28
	0,0b	4,3b	29,8a	0,0b	25,5a	11,9
Total	47	47	47	47	47	235
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

P<0,0001 - Teste Exato de Fisher seguido do teste de comparações múltiplas de proporções segundo ZAR

Percentuais seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente.

Os percentuais de INLJ e PRS não diferiram estatisticamente, mas diferiram dos demais

Tabela 9 - Distribuição de frequências das amostras segundo primer e positividade no Município de Bofete.

Amostras	Primer					Total
	INLA	INLC	INLJ	LM1/LM2	PRS	
Negativas	7	6	6	7	6	32
	100,0	85,7	85,7	100,0	85,7	91,4
Positivas	-	1	1	-	1	3
	0,0	14,3	14,3	0,0	14,3	8,6
Total	7	7	7	7	7	35
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

P=0,99 - Teste Exato de Fisher.

Não houve diferença entre as proporções

Tabela 10 - Distribuição de frequências das amostras segundo primer e positividade no Município de Botucatu.

Amostras	Primer					Total
	INLA	INLC	INLJ	LM1/LM2	PRS	
Negativas	2	2	2	2	1	9
	100,0	100,0	100,0	100,0	50,0	90,0
Positivas	-	-	-	-	1	1
	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	10,0
Total	2	2	2	2	2	10
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

P=0,99 - Teste Exato de Fisher.

Não houve diferença entre as proporções

Tabela 11 - Distribuição de frequências das amostras segundo primer e positividade no Município de Cerqueira César.

Amostras	Primer					Total
	INLA	INLC	INLJ	LM1/LM2	PRS	
Negativas	10	5	9	10	10	44
	100,0	50,0	90,0	100,0	100,0	88,0
Positivas	-	5	1	-	-	6
	0,0b	50,0a	10,0a	0,0b	0,0b	12,0
Total	10	10	10	10	10	50
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

P=0,003 Teste Exato de Fisher seguido do teste de comparações múltiplas de proporções segundo ZAR

Percentuais seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente.

Os percentuais de INLC e INLJ não diferiram estatisticamente, mas diferiram dos demais.

Tabela 12 - Distribuição de frequências das amostras segundo primer e positividade no Município de Pardinho.

Amostras	Primer					Total
	INLA	INLC	INLJ	LM1/LM2	PRS	
Negativas	16	11	16	16	14	73
	100,0	68,8	100,0	100,0	87,5	91,2
Positivas	-	5	-	-	2	7
	0,0b	31,2a	0,0b	0,0b	12,5ab	8,8
Total	16	16	16	16	16	80
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

P=0,004 Teste Exato de Fisher seguido do teste de comparações múltiplas de proporções segundo ZAR.

Percentuais seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente.

Os percentuais de INLC e PRS não diferiram estatisticamente, mas INLC difere dos demais e PRS não difere dos demais.

Tabela 13 - Distribuição de frequências das amostras segundo local e positividade no *primer* inLC.

Amostras	Local								Total
	Anhembi	Arandu	Avaré	Bauru	Bofete	Botucatu	Cerq. César	Pardinho	
Negativas	5	3	45	3	6	2	5	11	80
	38,5	75,0	95,7	100,0	85,7	100,0	50,0	68,8	78,4
Positivas	8	1	2	-	1	-	5	5	22
	61,5a	25,0ab	4,3b	0,0b	14,3ab	0,0b	50,0a	31,2ab	21,6
Total	13	4	47	3	7	2	10	16	102
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

P<0,0001 Teste Exato de Fisher seguido do teste de comparações múltiplas de proporções segundo ZAR.

Percentuais seguidos de pelo menos 1 letra em comum não diferem estatisticamente.

Anhembi e Cerqueira César diferiram de Avaré, Bauru e Botucatu. Arandu, Bofete e Pardinho tiveram valores intermediários que não diferiram dos maiores e nem dos menores.

Tabela 14 - Distribuição de frequências das amostras segundo local e positividade no *primer* inIJ.

Amostras	Local								Total
	Anhembi	Arandu	Avaré	Bauru	Bofete	Botucatu	Cerq. César	Pardinho	
Negativas	6	4	33	3	6	2	9	16	79
	46,2	100,0	70,2	100,0	85,7	100,0	90,0	100,0	77,5
Positivas	7	-	14	-	1	-	1	-	23
	53,8a	0,0b	29,8a	0,0b	14,3ab	0,0b	10,0ab	0,0b	22,5
Total	13	4	47	3	7	2	10	16	102
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

P=0,01 Teste Exato de Fisher seguido do teste de comparações múltiplas de proporções segundo ZAR.

Percentuais seguidos de pelo menos 1 letra em comum não diferem estatisticamente.

Anhembi e Avaré diferiram de Arandu, Bauru, Botucatu e Pardinho.

Bofete e Cerqueira César tiveram valores intermediários que não diferiram dos maiores e nem dos menores.

Tabela 15 - Distribuição de frequências das amostras segundo local e positividade no *primer* PRS.

Amostras	Local								Total
	Anhembi	Arandu	Avaré	Bauru	Bofete	Botucatu	Cerq. César	Pardinho	
Negativas	8	4	35	3	6	1	10	14	81
	61,5	100,0	74,5	100,0	85,7	50,0	100,0	87,5	79,4
Positivas	5	-	12	-	1	1	-	2	21
	38,5	0,0	25,5	0,0	14,3	50,0	0,0	12,5	20,6
Total	13	4	47	3	7	2	10	16	102
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

P=0,23 - Teste Exato de Fisher.

Não houve diferença entre as proporções.

Tabela 16 - Distribuição das amostras com mais de um resultado positivo.

Local	PRS/ inIC Nº (%)	PRS/inIJ Nº (%)	inIC/ inIJ Nº (%)	PRS/ inIC/ inIJ Nº (%)	Total
Avaré	1(3,6)	2(7,2)	1(3,6)	-(0,0)	28
Cerqueira	-(0,0)	-(0,0)	1(16,7)	-(0,0)	6
César					
Pardinho	1(14,3)	1(14,3)	2(28,6)	1(14,3)	7
Anhembi	1(5,0)	1(5,0)	1(5,0)	1(5,0)	20

P=0,95 Teste Exato de Fisher

6 DISCUSSÃO

Pudemos observar neste estudo 21 amostras de leite positivas para o *primer* PRS, o qual amplifica um segmento do gene *prs* (*lmo0509*), comum ao gênero *Listeria* spp. resultando em uma prevalência de 20,59%; ainda, 23 amostras foram positivas ao *primer* inIJ, o qual amplifica um segmento do gene *lmo2821*, resultando em uma prevalência de 22,55% e 22 amostras positivas ao *primer* inIC (*lmo1786*), com prevalência de 21,57%.

A literatura e Agências de Saúde trazem uma gama de estudos e estatísticas sobre a infecção humana por *L. monocytogenes*, sendo estes utilizados como base para fundamentar este trabalho. Foram utilizados também artigos e estudos sobre sua ecologia nas fazendas leiteiras e plantas processadoras de leite. Fatores que afetam a sensibilidade na detecção do patógeno por PCR bem como estudos sobre a ocorrência do mesmo no leite e seus derivados também foram utilizados com parâmetro de discussão.

Ao realizar o levantamento bibliográfico observou-se que a ocorrência do patógeno no leite cru tem sido detectado com uma prevalência muito variável nos mais diversos países. Nos Estados Unidos vários estudos em amostras de leite cru de tanques a granel relataram uma variável faixa de prevalência para *L. monocytogenes*, indo de zero a até 19,7% (LEE et al., 2019). Da mesma forma na Europa estudos apontam prevalências que vão de zero (SCHODER et al.,

2011; GIACOMETTI et al., 2015; BOTSARIS et al., 2016) a até 29% (KALMUS et al., 2015).

No Brasil, levantamento bibliográfico realizado por Barancelli et al. (2011) relatou ocorrência de zero até 37% em leite cru e de zero a 41% em queijos. Outros estudos mais recentes não encontraram nenhuma amostra positiva em amostras de leite (OLIVEIRA et al., 2020) e queijos (OXARAN et al., 2017).

Várias fontes ambientais vêm sendo relatadas como possíveis reservatórios e origem de contaminação por *L. monocytogenes* durante a ordenha e armazenamento do leite (CASTRO 2018; WHITMAN et al., 2020; RODRIGUEZ et al., 2021; BAGATELLA; TAVARES-GOMES; OEVERMANN; 2021). Características como crescimento em uma ampla faixa de temperatura, serem intracelulares, anaeróbia facultativas e halotolerantes conferem ao patógeno notória resistência e adaptabilidade a ambientes hostis, permitindo estarem amplamente difundidas no ambiente, em especial em fazendas leiteiras (BARANCELLI et al., 2011; COLAGIORGI et al., 2016; RADOSHEVICH, COSSART, 2018; RODRIGUEZ et al., 2021).

Água e solo são locais onde comumente pode-se isolar a bactéria e como consequência no pasto, portanto, expondo diretamente os animais pela alimentação. Silagens de baixa qualidade são consideradas uma importante fonte de infecção aos animais, que eliminam o patógeno pelas fezes, contaminando potencialmente solo, culturas e recursos hídricos, perpetuando o ciclo (CASTRO et al., 2018; RODRIGUEZ et al., 2021).

Mohammed et al. (2009) destacam a importância da sanidade dos rebanhos leiteiros, visto que, em um estudo, a presença do patógeno em amostras fecais atingiu uma prevalência de 43% em amostras coletadas, representando uma possível fonte de contaminação do leite cru. Tal panorama posiciona o bovino como um vetor-chave na manutenção do patógeno no ambiente (DHAMA et al., 2015; FOX; JIANG; GOBIUS, 2018).

A sazonalidade também foi relatada como fator de influência no aumento da *L. monocytogenes*. Estudos determinaram uma prevalência maior do patógeno no ambiente de alojamento hibernar durante o inverno, com pico na primavera que pode explicar-se pela alimentação prevalentemente por silagem

e exposição íntima a fômites (DHAMA et al., 2015; CASTRO et al., 2018; BAGATELLA; TAVARES-GOMES; OEVERMANN, 2021) o que nos leva a concluir que as estratégias para debelar e controlar os riscos devem ser redobrados nessa época do ano, sobretudo na higiene dos animais pré ordenha (DHAMA et al., 2015; CASTRO et al., 2018).

A presença de *L. monocytogenes* nos úberes dos animais antes da ordenha tem sido descrito como principal fator de risco para presença da mesma no leite. A bactéria, por contaminação cruzada, pode estar presente por falhas de higiene pré ordenha ou como infecção intramamária (BOURRY; POUTREL; ROCOURT, 1995; RODRIGUEZ et al., 2021; CASTRO, 2022). Vários estudos (BARANCELLI et al., 2011; KONOSONOKA et al., 2012; FOX; JIANG; GOBIUS, 2018; WHITMAN et al., 2020; RODRIGUEZ et al., 2021) reportam casos de mastite por infecção ascendente, com o patógeno, presente no meio ambiente, capaz de invadir o canal do teto e induzir uma infecção (BOURRY; POUTREL; ROCOURT, 1995; BAGATELLA; TAVARES-GOMES; OEVERMANN, 2021).

Silagens contaminadas são repetidamente apontadas como fonte de infecção ao animal que, ao ingerir alimento com o patógeno, este atinge o úbere pela via hematogênica, com consequente excreção no leite (WINTER et al., 2004; FOX; JIANG; GOBIUS, 2018; ADDIS et al., 2019; BAGATELLA; TAVARES-GOMES; OEVERMANN, 2021).

O leite cru contaminado, ao ser utilizado como matéria prima na produção de derivados, pode ser uma fonte de contaminação de equipamentos de ordenha, filtros, tanques de expansão (WHITMAN et al., 2020; RODRIGUEZ et al., 2021) e de plantas processadoras de produtos lácteos, o que pode ser agravado pela capacidade de colonização e produção de biofilmes característicos de cepas de *L. monocytogenes*, conferindo ao patógeno maior adesão e resistência a sanitizantes (BARANCELLI et al., 2011; COLAGIORGI et al., 2016; CASTRO et al., 2018).

Durante três anos, um estudo realizado por Leong et al. (2017) monitorou a presença e a persistência de *L. monocytogenes* em instalações e alimentos prontos de empresas da Irlanda, e constataram que das 54 instalações monitoradas, 16 apresentaram a persistência de pelo menos uma cepa de *L. monocytogenes*. Isso pode representar um alto risco para contaminação cruzada

de produtos processados. *L. monocytogenes* pode chegar ao ambiente de produção de alimentos por meio de múltiplos fatores, como a introdução de matérias primas com a presença do patógeno, ou por fômites, pragas e até mesmo funcionários portadores da bactéria (GRAY *et al.*, 2021), podendo colonizar o ambiente de produção e conseqüentemente, contaminar alimentos, principalmente os prontos para consumo.

Compreender os vários fatores que influem na sobrevivência, colonização e patogenicidade é de extrema importância pois, embora nem todas as cepas causem listeriose, existem uma variedade de mecanismos genéticos e características fenotípicas que podem indicar a capacidade de cepas sobreviverem ou causarem doenças (CASTRO *et al.*, 2018).

Avaliar os fatores de risco subsidia o desenvolvimento de estratégias eficazes de gestão de risco, analisando informações necessárias para abordar questões de impacto para a saúde pública especialmente em produtos alimentícios prontos para o consumo (LEONG *et al.*, 2017).

Muito se tem discutido, com o intuito de padronizar um protocolo eficiente e de rápida detecção dos genes determinantes dos fatores de virulência para a *L. monocytogenes* em alimentos e ambientes; porém, a biodiversidade da *Listeria*, bem como a variedade de fatores de virulência e de fatores que afetam a sensibilidade na PCR faz desse um desafio abordado em vários estudos (AZNAR; ALARCÓN, 2003; LIU *et al.*, 2007; AMAGLIANI *et al.*, 2007; PERES *et al.*, 2010; DHAMA *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2017).

Um ensaio estabelecido por Liu *et al.* (2007) padronizou uma PCR baseada na detecção de genes que codificam *internalinas*, responsáveis pela internalização, com o objetivo de determinar a virulência da cepa com *primers* que detectem o gênero e faça a diferenciação entre as patogênicas e não patogênicas, servindo de base para a escolha dos *primers* utilizados.

Aznar e Alarcon (2003) testaram vários parâmetros que afetam a sensibilidade da detecção por PCR, utilizando dentre outros o *primer* LM1/LM2, projetado para amplificar uma região do gene *hlyA*, codificador da listeriolisina O. Para determinar a sensibilidade de detecção, os autores realizaram o isolamento e enriquecimento de culturas de *L. monocytogenes* e as utilizaram

para realizar PCR direto, a partir de alimentos artificialmente contaminados com células dessas culturas e PCR de alimentos naturalmente contaminados. Os fatores que influenciaram a diminuição da sensibilidade apontados foi a presença de inibidores de reação presentes na matriz alimentar, a especificidade do *primer*, se a detecção foi direta ou se houve etapa de enriquecimento.

Segundo levantamento realizado por Chen et al. (2017), a PCR visando o gene *hlyA* se mostrou sensível, rápida e mais popularmente utilizada; porém, algumas cepas de *L. monocytogenes* testadas foram negativas para este gene. Outro trabalho de Aznar e Alarcón em 2002 concluiu que, dos *primers* testados no estudo de 2002, o que apresentou melhor eficiência foi o *primer* LM1/LM2 pela especificidade para a detecção do patógeno; porém, foi o que apresentou menor sensibilidade (AZNAR; ALARCÓN, 2003). Tais dados podem explicar a não detecção de amostras positivas com a utilização desse *primer* em nossos resultados.

Observa-se de uma forma geral que, por mais específico que o *primer* seja, é necessário que sua constituição não favoreça a formação de estruturas indesejáveis, de forma a impedir a sua conexão com o DNA pretendido, proporcionando um bom resultado na PCR.

Thornton e Basu (2011), descreveram critérios para seleção de *primers*, para que sejam adequadamente projetados a fim de possibilitar maior especificidade e eficiência da PCR. Um dos parâmetros descritos é a temperatura de *melting*, onde a temperatura do par de *primer* deve ter, no máximo, 5°C de diferença entre si. A proporção de Guanina e Citosina não deve ser maior que 60%, pois porcentagens maiores podem aumentar a temperatura necessária para desnaturação das fitas de DNA (*melting*). Outra característica apontada é que os *primers* não devem ser autocomplementares (*self-complementary*) ou complementares entre si (*3' self-complementary*) para que não formem ligações entre si (dímeros, self-dímeros e hairpin), não sendo interessantes valores acima de 5.

Nesse estudo, todos os *primers* apresentaram proporção menor que 60%. A relação entre as temperaturas de *melting* dos *primers* complementares também estavam abaixo de 5°C de diferença. Os valores de *self-complementary* e *3' self complementary*, foram avaliados e os resultados desejados são abaixo

de 5, pois valores elevados indicam a probabilidade de formação de dímeros, característica que pode diminuir a qualidade do *primer*, resultando em amplicons indesejados.

Nos resultados obtidos, cada par de *primer* específico para *Listeria* produziu apenas os amplicons de PCR do tamanho esperado e as sequências de *primers* foram confirmadas pelo banco de dados BLASTn.

O presente estudo apresenta resultados importantes tendo-se detectado os genes *inlJ* (*Imo2821*) em 23 amostras com o *primer* *inlJ* (22,55%). Em 22 amostras com o *primer* *inlC* e em 21 amostras foi detectado o gene *prs* (*phosphoribosyl pyrophosphate synthetase*) com o *primer* *PRS(f/r)* (20,59%). Para os *primers* LM1/LM2 e *inlA* não houve detecção de DNA. Apenas sete amostras apresentaram os genes *prs* e *inlJ* simultaneamente. A expectativa era de que as amostras positivas para o *inlJ* fossem detectadas pelo *primer* *PRS(f/r)*, por se tratar de um *primer* de sequência gênica comum à espécie, porém apenas sete amostras (6,86%) obtiveram resultados comuns aos dois *primers*.

Vários fatores podem influenciar os resultados das análises, tais como a sensibilidade das bactérias do gênero *Listeria* frente à competição com a microflora contaminante e microflora natural do leite cru (ALLISON; CHOWDHURY; FOULADKHAH, 2018), escolha do *primer* ou baixa qualidade da amostra. Inibidores também tem sido relatado de forma negativa na sensibilidade da técnica de PCR (AZNAR; ALARCÓN, 2003).

Cabe ressaltar que, mesmo seguindo o protocolo de ciclagem da PCR preconizado por Liu et al. (2007), para os *primers* *inlC* e *inlJ*, não houve amplificação do controle positivo, o que nos levou a utilizar o ciclo preconizado por Doumith et al. (2004), obtendo-se assim a amplificação do DNA alvo dos amplicons. Deve-se levar em consideração que vários fatores podem influenciar os resultados de análises moleculares, como a escolha do *primer* ou baixa qualidade da amostra. Inibidores também tem sido relatado de forma negativa na sensibilidade da técnica de PCR (AZNAR; ALARCÓN, 2003).

As amostras positivas às provas moleculares para mais de um *primer* foram submetidas ao cultivo microbiológico de *L. monocytogenes* de amostras de leite com a finalidade de avaliar as características fenotípicas das colônias e

a viabilidade da bactéria. No entanto, não foi possível o isolamento de *Listeria monocytogenes* a partir das amostras positivas às provas moleculares para mais de um *primer*, o que poderia ser considerado como uma limitação do estudo, tendo em vista a competição microbiana devido a grande quantidade de bactérias presentes no leite do tanque, ainda que se tenha utilizado de meios específicos para o isolamento de *Listeria*, bem como pela sensibilidade das bactérias do gênero *Listeria* frente à competição com a microflora contaminante e microflora natural do leite cru (ALLISON; CHOWDHURY; FOULADKHAH, 2018). Além disso, a viabilidade da bactéria pode ser influenciada pela interação entre os fatores que interferem na sua sobrevivência como pH, atividade de água, osmolaridade, número de microrganismos e armazenamento (MOHAMMADI et al., 2011; EKONOMOU et al., 2020). O efeito do congelamento submete as células a fatores estressantes e podem causar injúrias, tais como cisalhamento mecânico, alteração osmótica, lesões de congelamento e danos às paredes ou membranas celulares causada pelas tensões mecânicas dos cristais de gelo formados no meio externo ou no interior das células, que podem acarretar inativação das mesmas (MOHAMMADI et al., 2011; BOZIARIS; PARLAPANI; MIRELES DEWITT, 2021)

O aumento da demanda por leite cru pelos consumidores vem ganhando espaço devido a questões ligadas a potenciais benefícios à saúde e a melhor qualidade nutricional e sensorial em relação ao leite pasteurizado (BRICK et al., 2020; GÓMEZ-CORTÉS; JUÁREZ; DE LA FUENTE, 2018), atreladas ao intuito de beneficiar economicamente a agricultura orgânica e familiar (HECKMAN, 2019), o que evidencia a necessidade de atenção sobre os possíveis riscos do aumento da prática de consumo do leite cru e derivados. As amostras de leite analisadas são procedentes de pequenas propriedades, cujos produtores utilizam o leite cru para a produção de queijo e manteiga artesanalmente e seu comércio constitui-se como fonte de renda alternativa.

A vigilância contínua da prevalência da *L. monocytogenes* é necessária para detecção de fontes de contaminações e alimentos que possam representar riscos à saúde (OLIVEIRA et al., 2019). A presença do patógeno nas amostras de leite cru avaliadas corrobora com o risco potencial de listeriose de origem alimentar.

Uma compreensão mais clara da ecologia e patogênese da listeriose e sua epidemiologia entre meio ambiente, animais e seres humanos subsidiará o desenvolvimento de medidas eficientes de vigilância e controle para prevenir doenças e transmissão para humanos de acordo com o conceito de Saúde Única (RODRIGUEZ et al., 2021).

Em relação às Boas Práticas de Fabricação nas unidades de processamento de produtos lácteos, a área de recebimento da matéria prima ou leite cru devem ser efetivamente separadas da área de produção final a fim de evitar contaminações cruzadas decorrente de contra fluxos das áreas, atreladas à um programa de monitoramento tanto ambiental quanto nos produtos prontos (LEONG et al., 2017; MAĆKIW et al., 2021).

Embora a temperatura de resfriamento mantenha o crescimento dos agentes patogênicos sob controle, deve-se atentar para patógenos que podem sobreviver e se multiplicar bem em temperaturas de refrigeração, como é o caso da *L. monocytogenes*, que pode entrar como contaminante em várias etapas do processo da obtenção do leite, e sua presença é sugestiva de falhas de higiene no processo (REGUILLO et al., 2018; RODRIGUEZ et al., 2021).

Medidas rigorosas de higiene ambiental, sanidade dos rebanhos, implementação de boas práticas em laticínios, rastreamento da bactéria no ambiente, bem como nos animais, além do tratamento térmico do leite são de suma importância para evitar sua disseminação e controlar os riscos à saúde relacionados ao consumo do leite cru ou sua utilização como matéria prima para obtenção de seus derivados (RODRIGUEZ et al., 2021).

Desta forma, há a necessidade de medidas educativas e higiênico-sanitárias nessas propriedades visto que a detecção do patógeno pode ser utilizada como indicador de higiene deficiente em etapas do processo, além do risco à saúde humana. Implantar medidas de prevenção e controle são ações importantes no processo de obtenção e armazenamento do leite cru com o intuito de minimizar os riscos de contaminação por *L. monocytogenes*.

O monitoramento e registros de surtos de listeriose no mundo demonstra a ocorrência da doença veiculada por alimentos (WHO, 2018; EFSA, 2021) e, a despeito de não haver registros que correlacionem a listeriose ao consumo de alimentos contaminados no Brasil, a presença de *L. monocytogenes* é

frequentemente relatada em diversos alimentos no país, nos levando a crer que a doença é subnotificada (OLIVEIRA et al., 2019). Não obstante, legislação nacional não contempla o monitoramento desse patógeno em produtos de origem animal e estabelece critérios de ausência apenas para alguns tipos de queijo (BRASIL, 2001), sendo aconselhável a inclusão do patógeno em um programa de monitoramento.

Ferramentas que possibilitem o rastreamento das cepas de *L. monocytogenes* e auxilie na determinação da origem das amostras contaminadas pode direcionar ações centralizadas em propriedades com maior ocorrência do patógeno.

Quanto às análises dos *primers*, fica clara a importância da bioinformática como ferramenta e do sequenciamento genético sistematicamente depositados no GenBank do NCBI, para que as pesquisas utilizando a detecção de DNA de qualquer microrganismo seja atualizada, propiciando informações atualizadas sobre os genomas em diferentes áreas do mundo, visto que mutações em regiões não estáveis ou novos organismos não incluídos podem nos direcionar para falsos positivos ou negativos.

Em relação à análise espacial, todos os municípios avaliados apresentaram amostras de leite de tanque positivas na detecção molecular para *L. monocytogenes*, exceto Bauru. No entanto, tal resultado possa ser devido à amostragem deste município ser muito pequena (somente três amostras) em relação aos municípios avaliados.

CONCLUSÕES

- Foi possível detectar o DNA de *L. monocytogenes* nas amostras de leite avaliadas;

- Os genes *prs*, *inlJ* (*Imo2821*) e *inlC* (*Imo1786*) de *L. monocytogenes* foram possíveis de serem detectados pela técnica de PCR, a qual mostrou-se como uma ferramenta importante na identificação das amostras positivas;

- O sequenciamento genético possibilitou a confirmação das amostras de leite positivas à PCR para *L. monocytogenes*, sendo submetidas à análise espacial, a fim de verificar a distribuição das propriedades de ocorrência do patógeno.

- A análise espacial permitiu verificar que, no universo amostral avaliado, está circulando DNA de *L. monocytogenes* em amostras de leite de tanque localizadas em pequenas propriedades rurais.

Nossos achados indicam que foi possível a detecção molecular de *Listeria monocytogenes* nas amostras de leite de tanque avaliadas, em detrimento do cultivo microbiológico, em que não houve o isolamento. A técnica de PCR mostrou-se como uma ferramenta de importância na identificação das amostras positivas, particularmente para os genes *prs* e *inlJ* (lmo2821) de *L. monocytogenes*, confirmadas pelo sequenciamento genético. Verificou-se ainda que, com o protocolo de ciclagem preconizado por Doumith et al. (2004) foi possível a amplificação do DNA alvo dos amplicons. Pela análise espacial, foi possível verificar que, no universo amostral estudado, foi possível a detecção molecular por *L. monocytogenes* em amostras de leite de tanque localizadas em pequenas propriedades rurais. Assim, faz-se necessário a implementação de medidas educativas, já que a detecção molecular deste agente sinaliza a necessidade da implementação de medidas de prevenção e controle para o processo de obtenção e armazenamento do leite cru com o intuito de minimizar os riscos de contaminação por *L. monocytogenes*.

REFERENCIAS

ADDIS, M. F.; CUBEDDU, T.; PILICCHI, Y.; ROCCA, S.; PICCININI, R. Chronic intramammary infection by *Listeria monocytogenes* in a clinically healthy goat – a case report. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 229, 5 jul. 2019. DOI [10.1186/s12917-019-1989-3](https://doi.org/10.1186/s12917-019-1989-3). Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1989-3>. Acesso em: 18 fev. 2022.

AKRAMI-MOHAJERI, F.; DERAKHSHAN, Z.; FERRANTE, M.; HAMIDIYAN, N.; SOLEYMANI, M.; CONTI, G. O.; TAFTI, R. D. The prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp in raw milk and traditional dairy products delivered in Yazd, central Iran (2016). **Food and Chemical Toxicology**, v. 114, p. 141–144, 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691518300735>. Acesso em: 5 jan. 2022.

ALLAM, M.; TAU, N.; SMOUSE, S. L.; MTSHALI, P. S.; MNYAMENI, F.; KHUMALO, Z. T. H.; ISMAIL, A.; GOVENDER, N.; THOMAS, J.; SMITH, A. M. Whole-Genome Sequences of *Listeria Monocytogenes* Sequence Type 6 Isolates Associated with a Large Foodborne Outbreak in South Africa, 2017 to 2018. *Genome Announcements*, v. 6, n. 25, p. e00538-18, 21 jun. 2018. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/genomeA.00538-18>. Acesso em: 15 ago. 2022

ALLISON, A.; CHOWDHURY, S.; FOULADKHAH, A. Synergism of Mild Heat and High-Pressure Pasteurization Against *Listeria monocytogenes* and Natural Microflora in Phosphate-Buffered Saline and Raw Milk. **Microorganisms**, v. 6, n. 4, 2018. DOI [10.3390/microorganisms6040102](https://doi.org/10.3390/microorganisms6040102). Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/6/4/102>.

AMAGLIANI, G.; GIAMMARINI, C.; OMICCIOLI, E.; BRANDI, G.; MAGNANI, M. Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different DNA extraction methods. **Food Control**, v. 18, n. 9, p. 1137–1142, set. 2007. DOI [10.1016/j.foodcont.2006.06.012](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.06.012). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713506001964>. Acesso em: 4 mar. 2022.

ARCHER, D. L. The evolution of FDA's policy on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in the United States. **Current Opinion in Food Science**, v. 20, p. 64–68, abr. 2018. DOI [10.1016/j.cofs.2018.03.007](https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.03.007). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214799317301728>. Acesso em: 15 mar. 2022.

AZNAR, R.; ALARCÓN, B. On the Specificity of PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in Food: a Comparison of Published Primers. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 109–119, jan. 2002. DOI [10.1078/0723-2020-00079](https://doi.org/10.1078/0723-2020-00079). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0723202004700922>. Acesso em: 10 mar. 2022.

AZNAR, R.; ALARCÓN, B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 958–966, 2003. DOI [10.1046/j.1365-2672.2003.02066.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02066.x). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2672.2003.02066.x>. Acesso em: 25 fev. 2022.

BAGATELLA, S.; TAVARES-GOMES, L.; OEVERMANN, A. *Listeria monocytogenes* at the interface between ruminants and humans: A comparative pathology and pathogenesis review. **Veterinary Pathology**, p. 03009858211052659, 2 dez. 2021. DOI [10.1177/03009858211052659](https://doi.org/10.1177/03009858211052659). Disponível em: <https://doi.org/10.1177/03009858211052659>. Acesso em: 31 jan. 2022.

BARANCELLI, G. V.; SILVA-CRUZ, J. V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C. A. F. *Listeria Monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 155–168, mar. 2011. DOI [10.1590/1808-1657v78p1552011](https://doi.org/10.1590/1808-1657v78p1552011). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572011000100155&lng=pt. Acesso em: 18 fev. 2022.

BOONE, I.; ROSNER, B.; LACHMANN, R.; D'ERRICO, M. L.; IANNETTI, L.; STEDE, Y. V. der; BOELAERT, F.; ETHELBERG, S.; ECKMANN, T.; STARK, K.; HALLER, S.; WILKING, H. Healthcare-associated foodborne outbreaks in high-income countries: a literature review and surveillance study, 16 OECD countries, 2001 to 2019*. **Eurosurveillance**, v. 26, n. 41, p. 2001278, 14 out. 2021. DOI [10.2807/1560-7917.ES.2021.26.41.2001278](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.41.2001278). Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.41.2001278>. Acesso em: 12 jan. 2022.

BORDER, P. M.; HOWARD, J. J.; PLASTOW, G. S.; SIGGENS, K. W. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 158–162, set. 1990. DOI [10.1111/j.1472-765X.1990.tb00149.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1990.tb00149.x). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.1990.tb00149.x>. Acesso em: 25 fev. 2022.

BOTSARIS, G.; NIKOLAOU, K.; LIAPI, M.; PIPIS, C. Prevalence of *Listeria* Spp. and *Listeria Monocytogenes* in Cattle Farms in Cyprus using Bulk Tank Milk Samples: prevalence of *listeria* spp. and *listeria monocytogenes*. **Journal of Food Safety**, v. 36, n. 4, p. 482–488, nov. 2016. DOI [10.1111/jfs.12265](https://doi.org/10.1111/jfs.12265). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfs.12265>. Acesso em: 3 mar. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS. 2022. Disponível em: <https://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude-tabnet/>. Acesso em: 3 mar. 2022

BRASIL. Decreto nº 9.064, de 31 de maio de 2017. Dispõe sobre a Unidade Familiar de Produção Agrária, institui o Cadastro Nacional da Agricultura Familiar e regulamenta a Lei nº 11.326, de 24 de julho de 2006, que estabelece as

diretrizes para a formulação da Política Nacional da Agricultura Familiar e empreendimentos familiares rurais. **Base Legislação da Presidência da República**. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <https://legislacao.presidencia.gov.br/atos/?tipo=DEC&numero=9064&ano=2017&ato=d88oXRE1UeZpWTd3c>. Acesso em: 14 ago. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Brasília, DF, 2001. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-12-de-2-de-janeiro-de-2001.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2022.

BRICK, T.; HETTINGA, K.; KIRCHNER, B.; PFAFFL, M. W.; EGE, M. J. The Beneficial Effect of Farm Milk Consumption on Asthma, Allergies, and Infections: From Meta-Analysis of Evidence to Clinical Trial. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 8, n. 3, p. 878-889.e3, 1 mar. 2020. DOI [10.1016/j.jaip.2019.11.017](https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.11.017). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213219819309560>. Acesso em: 5 jan. 2022.

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**, v. 75, p. 1–13, maio 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713516306892>. Acesso em: 22 ago. 2022.

BURIGO, A. C.; PORTO, M. F. Agenda 2030, saúde e sistemas alimentares em tempos de pandemia: da vulnerabilização à transformação necessária. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 26, n. 10, p. 4411–4424, out. 2021. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232021001004411&lng=pt. Acesso em: 15 ago. 2022.

CASTRO, H. Epidemiology and growth potential of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia pseudotuberculosis* in raw milk production. 4 mar. 2022. Disponível em: <https://helda.helsinki.fi/handle/10138/339807>. Acesso em: 18 fev. 2022.

CASTRO, H.; JAAKKONEN, A.; HAKKINEN, M.; KORKEALA, H.; LINDSTRÖM, M. Occurrence, Persistence, and Contamination Routes of *Listeria monocytogenes* Genotypes on Three Finnish Dairy Cattle Farms: a Longitudinal Study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 4, p. e02000-17, 15 fev. 2018. DOI [10.1128/AEM.02000-17](https://doi.org/10.1128/AEM.02000-17). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.02000-17>. Acesso em: 9 mar. 2022.

CARLIN, C. R.; LIAO, J.; WELLER, D.; GUO, X.; ORSI, R.; WIEDMANN, M. 2021. *Listeria cossartiae* sp. nov., *Listeria immobilis* sp. nov., *Listeria portnoyi* sp. nov. and *Listeria rustica* sp. nov., isolated from agricultural water and natural environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 004795, 17 maio 2021. DOI [10.1099/ijsem.0.004795](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004795). Disponível em:

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004795>. Acesso em: 5 jan. 2022.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Listeria (Listeriosis): prevention.** Atlanta, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/prevention.html>. Acesso em: 18 fev. 2022.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Listeria (Listeriosis).** Atlanta, 2021a. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/> Acesso em: 28 jan. 2022.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Listeria Outbreak Linked to Queso Fresco.** Atlanta, 2021b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/hispanic-soft-cheese-02-21/index.html>. Acesso em: 14 mar. 2022.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **The Listeria Initiative.** Atlanta, 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/surveillance/listeria-initiative.html>. Acesso em: 15 mar. 2022.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **National Outbreak Reporting System (NORS).** Atlanta, 2022. Disponível em: <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>. Acesso em: 17 fev. 2022.

CHEN, J.-Q.; HEALEY, S.; REGAN, P.; LAKSANALAMAI, P.; HU, Z. PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources. **Food Science and Human Wellness**, v. 6, n. 2, p. 39–59, jun. 2017. DOI [10.1016/j.fshw.2017.03.001](https://doi.org/10.1016/j.fshw.2017.03.001). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213453017300125>. Acesso em: 4 mar. 2022.

COLAGIORGI, A.; DI CICCIO, P.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; IANIERI, A. A Look inside the *Listeria monocytogenes* Biofilms Extracellular Matrix. **Microorganisms**, v. 4, n. 3, p. 22, 5 jul. 2016. DOI [10.3390/microorganisms4030022](https://doi.org/10.3390/microorganisms4030022). Disponível em: <http://www.mdpi.com/2076-2607/4/3/22>. Acesso em: 10 fev. 2022.

DESJARDINS, P.; CONKLIN, D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 45, p. 2565, 22 nov. 2010. <https://doi.org/10.3791/2565>.

COSSART, P.; VICENTE, M. F.; MENGAUD, J.; BAQUERO, F.; PEREZ-DIAZ, J. C.; BERCHE, P. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 11, p. 3629–3636, nov. 1989. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC259877/>. Acesso em: 8 mar. 2022.

DAGUER, H.; VICENTE, R. T.; COSTA, T. D.; Virmond, M. P.; Hamann, W.; AMENDOEIRA, M. R. R. Seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies

in cattle and slaughterhouse workers in the region of Pato Branco, Paraná, Brazil. **Ciência Rural**. v.34, n.4, p.1133-1137. 2004.

DEAN A. G.; SULLIVAN K. M.; SOE M. M. **OpenEpi** Menu. 6 abr. 2013. Disponível em: https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm. Acesso em: 15 mar. 2022. (Versão3,01).

DHAMA, K.; KARTHIK, K.; TIWARI, R.; SHABBIR, M. Z.; BARBUDDHE, S.; MALIK, S. V. S.; SINGH, R. K. Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, v. 35, n. 4, p. 211–235, 2 out. 2015. DOI [10.1080/01652176.2015.1063023](https://doi.org/10.1080/01652176.2015.1063023). Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01652176.2015.1063023>. Acesso em: 7 mar. 2022.

DISSON, O.; MOURA, A.; LECUIT, M. Making Sense of the Biodiversity and Virulence of *Listeria monocytogenes*. **Trends in Microbiology**, v. 29, n. 9, p. 811–822, 1 set. 2021. DOI [10.1016/j.tim.2021.01.008](https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.008). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X2100010X>. Acesso em: 17 fev. 2022.

DOUMITH, M.; BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; JACQUET, C.; MARTIN, P. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3819–3822, ago. 2004. DOI [10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004](https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004>. Acesso em: 25 fev. 2022.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). ANUÁRIO LEITE 2021: saúde única e total. – Portal Embrapa. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/224371/1/Anuario-Leite-2021.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2022.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) ANUÁRIO LEITE 2020: leite de vacas felizes. - Portal Embrapa. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1124722/anuario-leite-2020-leite-de-vacas-felizes>. Acesso em: 14 ago. 2022.

EUROPEAN COMMISSION. RASFF Window - Search (Version 2.1.0). [2022]. Disponível em: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search>. Acesso em: 16 fev. 2022.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY; EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, v. 19, n. 2, fev. 2021. DOI [10.2903/j.efsa.2021.6406](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406). Disponível em: <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2021.6406>. Acesso em: 28 jan. 2022.

EKONOMOU, S. I.; BULUT, S.; KARATZAS, K. A. G.; BOZIARIS, I. S. Inactivation of *Listeria Monocytogenes* in Raw and Hot Smoked Trout Fillets by

High Hydrostatic Pressure Processing Combined with Liquid Smoke and Freezing. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 64, p. 102427, ago. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856420303738>>. Acesso em: 5 nov. 2022.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 476–511, set. 1991. DOI [10.1128/mr.55.3.476-511.1991](https://doi.org/10.1128/mr.55.3.476-511.1991). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mr.55.3.476-511.1991>. Acesso em: 10 fev. 2022.

FOX, E. M.; JIANG, Y.; GOBIUS, K. S. Key pathogenic bacteria associated with dairy foods: On-farm ecology and products associated with foodborne pathogen transmission. **International Dairy Journal**, v. 84, p. 28–35, 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.03.013>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694618300797>. Acesso em: 28 jan. 2022.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 1–15, jan. 2007. DOI [10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.008](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.008). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160506004314>. Acesso em: 15 mar. 2022.

GIACOMETTI, F.; BONILAUDI, P.; ALBONETTI, S.; AMATISTE, S.; ARRIGONI, N.; BIANCHI, M.; BERTASI, B.; BILEI, S.; BOLZONI, G.; CASCONI, G.; COMIN, D.; DAMINELLI, P.; DECASTELLI, L.; MERIALDI, G.; MIONI, R.; PELI, A.; PETRUZZELLI, A.; TONUCCI, F.; BONERBA, E.; SERRAINO, A. Quantitative Risk Assessment of Human Salmonellosis and Listeriosis Related to the Consumption of Raw Milk in Italy. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 1, p. 13–21, 1 jan. 2015. DOI [10.4315/0362-028X.JFP-14-171](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-171). Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/78/1/13/174409/Quantitative-Risk-Assessment-of-Human>. Acesso em: 3 mar. 2022.

GÓMEZ-CORTÉS, P.; JUÁREZ, M.; DE LA FUENTE, M. A. Milk fatty acids and potential health benefits: An updated vision. **Trends in Food Science & Technology**, v. 81, p. 1–9, nov. 2018. DOI [10.1016/j.tifs.2018.08.014](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.014). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224418303431>. Acesso em: 3 mar. 2022.

GRAY, J. A.; CHANDRY, P. S.; KAUR, M.; KOCHARUNCHITT, C.; BOWMAN, J. P.; FOX, E. M. Characterisation of *Listeria Monocytogenes* Food-Associated Isolates to Assess Environmental Fitness and Virulence Potential. **International Journal of Food Microbiology**, v. 350, p. 109247, jul. 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160521002063>. Acesso em: 22 ago. 2022.

HECKMAN, J. R. Securing fresh food from fertile soil, challenges to the organic and raw milk movements. **Renewable Agriculture and Food Systems**, v. 34, n.

5, p. 472–485, out. 2019. DOI [10.1017/S1742170517000618](https://doi.org/10.1017/S1742170517000618). Disponível em: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1742170517000618/type/journal_article. Acesso em: 3 mar. 2022.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE, 2017. Tabela 6912: Número de estabelecimentos agropecuários que produziram leite de vaca, Vacas ordenhadas nos estabelecimentos agropecuários, Quantidade produzida de leite de vaca, Valor da produção de leite de vaca, Número de estabelecimentos agropecuários que venderam leite de vaca cru, Quantidade vendida de leite de vaca cru e Valor da venda de leite de vaca cru, por tipologia, condição do produtor em relação às terras e grupos de cabeças de bovinos. EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). ANUÁRIO LEITE 2020: LEITE DE VACAS FELIZES. São Paulo, Brasil, p. 102, 2020. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6912#resultado>. Acesso em: 14 ago. 2022.

KALMUS, P.; KRAMARENKO, T.; ROASTO, M.; MEREMÄE, K.; VILTROP, A. Quality of raw milk intended for direct consumption in Estonia. **Food Control**, v. 51, p. 135–139, 1 maio 2015. DOI [10.1016/j.foodcont.2014.11.018](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.018). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514006525>. Acesso em: 3 mar. 2022.

KONOSONOKA, I. H.; JEMELJANOV, A.; OSMANE, B.; IKAUNIECE, D.; GULBE, G. Incidence of *Listeria* spp. in Dairy Cows Feed and Raw Milk in Latvia. **ISRN Veterinary Science**, v. 2012, p. e435187, 26 jan. 2012. DOI [10.5402/2012/435187](https://doi.org/10.5402/2012/435187). Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/435187/>. Acesso em: 18 fev. 2022.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 1 jun. 2018. DOI [10.1093/molbev/msy096](https://doi.org/10.1093/molbev/msy096). Disponível em: <https://academic.oup.com/mbe/article/35/6/1547/4990887>. Acesso em: 15 mar. 2022.

LEE, S. H. I.; CAPPATO, L. P.; GUIMARÃES, J. T.; BALTHAZAR, C. F.; ROCHA, R. S.; FRANCO, L. T.; DA CRUZ, A. G.; CORASSIN, C. H.; DE OLIVEIRA, C. A. F. *Listeria monocytogenes* in Milk: Occurrence and Recent Advances in Methods for Inactivation. **Beverages**, v. 5, n. 1, p. 14, mar. 2019. DOI [10.3390/beverages5010014](https://doi.org/10.3390/beverages5010014). Disponível em: <https://www.mdpi.com/2306-5710/5/1/14>. Acesso em: 21 fev. 2022.

LEONG, D.; NICAOGÁIN, K.; LUQUE-SASTRE, L.; MCMANAMON, O.; HUNT, K.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; SCOLLARD, J.; SCHMALENBERGER, A.; FANNING, S.; O'BYRNE, C.; JORDAN, K. A 3-year multi-food study of the presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in 54 small food businesses in Ireland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 249, p. 18–26, maio 2017. DOI [10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.015](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.015). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160517300764>. Acesso em: 10 mar. 2022.

LIU, B.; TENG, Z.; WANG, J.; LU, G.; DENG, X.; LI, L. Inhibition of listeriolysin O oligomerization by lutein prevents *Listeria monocytogenes* infection. **Fitoterapia**, v. 116, p. 45–50, jan. 2017. DOI [10.1016/j.fitote.2016.11.012](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.11.012). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X16305792>. Acesso em: 7 mar. 2022.

LIU, D.; LAWRENCE, M. L.; AUSTIN, F. W.; AINSWORTH, A. J. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n. 2, p. 133–140, 1 nov. 2007. DOI [10.1016/j.mimet.2007.08.007](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.08.007). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701207002849>. Acesso em: 25 fev. 2022.

MAĆKIW, E.; KORSAK, D.; KOWALSKA, J.; FELIX, B.; STASIAK, M.; KUCHARZEK, K.; ANTOSZEWSKA, A.; POSTUPOLSKI, J. Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat food products in retail in Poland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 358, p. 109397, nov. 2021. DOI [10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109397](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109397). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160521003561>. Acesso em: 16 fev. 2022.

MATLE, I.; MBATHA, K. R.; MADOROBA, E. A Review of *Listeria Monocytogenes* from Meat and Meat Products: Epidemiology, Virulence Factors, Antimicrobial Resistance and Diagnosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 87, n. 1, 9 out. 2020. Disponível em: <http://www.ojvr.org/index.php/OJVR/article/view/1869>. Acesso em: 15 ago. 2022.

MAURY, M. M.; BRACQ-DIEYE, H.; HUANG, L.; VALES, G.; LAVINA, M.; THOUVENOT, P.; DISSON, O.; LECLERCQ, A.; BRISSE, S.; LECUIT, M. Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 2488, 6 jun. 2019. DOI [10.1038/s41467-019-10380-0](https://doi.org/10.1038/s41467-019-10380-0). Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-10380-0>. Acesso em: 18 fev. 2022.

MAZAHERI, T.; CERVANTES-HUAMÁN, B. R. H.; BERMÚDEZ-CAPDEVILA, M.; RIPOLES-AVILA, C.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. *Listeria Monocytogenes* Biofilms in the Food Industry: Is the Current Hygiene Program Sufficient to Combat the Persistence of the Pathogen? **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 181, 15 jan. 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/1/181>. Acesso em: 22 ago. 2022.

MCCOLLUM, J. T.; CRONQUIST, A. B.; SILK, B. J.; JACKSON, K. A.; O'CONNOR, K. A.; COSGROVE, S.; GOSSACK, J. P.; PARACHINI, S. S.; JAIN, N. S.; ETTESTAD, P.; IBRAHEEM, M.; CANTU, V.; JOSHI, M.; DUVERNOY, T.; FOGG, N. W.; GORNY, J. R.; MOGEN, K. M.; SPIRES, C.; TEITELL, P.; ... MAHON, B. E. Multistate Outbreak of Listeriosis Associated with Cantaloupe. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 10, p. 944–953, 5 set. 2013. DOI [10.1056/NEJMoa1215837](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215837). Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1215837>. Acesso em: 14 mar. 2022.

MOHAMMED, H. O.; STIPETIC, K.; MCDONOUGH, P. L.; GONZALEZ, R. N.; NYDAM, D. V.; ATWILL, E. R. Identification of potential on-farm sources of *Listeria monocytogenes* in herds of dairy cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 3, seq. American Journal of Veterinary Research, p. 383–388, 1 mar. 2009. DOI [10.2460/ajvr.70.3.383](https://doi.org/10.2460/ajvr.70.3.383). Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/view/journals/ajvr/70/3/ajvr.70.3.383.xml>. Acesso em: 4 mar. 2022.

MURRAY, E. G. D.; WEBB, R. A.; SWANN, M. B. R. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 29, n. 4, p. 407–439, 1926. DOI [10.1002/path.1700290409](https://doi.org/10.1002/path.1700290409). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/path.1700290409>. Acesso em: 17 fev. 2022.

NICAOGÁIN, K.; O'BYRNE, C. P. The Role of Stress and Stress Adaptations in Determining the Fate of the Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes* in the Food Chain. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 23 nov. 2016. DOI [10.3389/fmicb.2016.01865](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01865). Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01865/full>. Acesso em: 15 mar. 2022.

OLIGO ANALYZER. 2022. Disponível em: <https://www.idtdna.com/calc/analyser>. Acesso em: 11 mar. 2022.

OLIVEIRA, G. C.; JUNQUEIRA, N. B.; GUIMARÃES, F. de F.; SALINA, A.; DALANEZI, F. M.; MANTOVAN, K. B.; JOAQUIM, S. F.; MENOZZI, B.; H. *Listeria monocytogenes* in cow's milk produced by family-owned dairy farms. **Veterinária e Zootecnia**, v. 27, p. 1–10, 6 dez. 2020. DOI [10.35172/rvz.2020.v27.674](https://doi.org/10.35172/rvz.2020.v27.674). Disponível em: <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/674>. Acesso em: 16 fev. 2022.

OLIVEIRA, N. A.; BITTENCOURT, G. M.; BARANCELLI, G. V.; KAMIMURA, E. S.; LEE, S. H. I.; OLIVEIRA, C. A. F. *Listeria monocytogenes* in Brazilian foods: occurrence, risks to human health and their prevention. **Current Research in Nutrition and Food Science Journal**, v. 7, n. 2, p. 320–330, 31 ago. 2019. DOI [10.12944/CRNFSJ.7.2.02](https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.7.2.02). Disponível em: <http://www.foodandnutritionjournal.org/volume7number2/listeria-monocytogenes-in-brazilian-foods-occurrence-risks-to-human-health-and-their-prevention/>. Acesso em: 15 mar. 2022.

OLIVER, S. P.; BOOR, K. J.; MURPHY, S. C.; MURINDA, S. E. Food Safety Hazards Associated with Consumption of Raw Milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 7, p. 793–806, set. 2009. DOI [10.1089/fpd.2009.0302](https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0302). Disponível em: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2009.0302>. Acesso em: 15 mar. 2022.

ORSI, Renato H.; WIEDMANN, Martin. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl Microbiol Biotechnol* (2016) 100:5273–5287. DOI [10.1007/s00253-016-7552-2](https://doi.org/10.1007/s00253-016-7552-2)

O'CALLAGHAN, T. F.; SUGRUE, I.; HILL, C.; ROSS, R. P.; STANTON, C. Chapter 7 - Nutritional Aspects of Raw Milk: A Beneficial or Hazardous Food Choice. In: NERO, L. A.; DE CARVALHO, A. F. (orgs.). **Raw Milk**. [S. l.]: Academic Press, 2019. p. 127–148. DOI [10.1016/B978-0-12-810530-6.00007-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810530-6.00007-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128105306000079>.

OXARAN, V.; LEE, S. H. I.; CHAUL, L. T.; CORASSIN, C. H.; BARANCELLI, G. V.; ALVES, V. F.; DE OLIVEIRA, C. A. F.; GRAM, L.; DE MARTINIS, E. C. P. *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. **Food Microbiology**, v. 68, p. 16–23, dez. 2017. DOI [10.1016/j.fm.2017.06.012](https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.012). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002016309327>. Acesso em: 3 mar. 2022.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; CASTRO, R.; POSADA-IZQUIERDO, G. D.; VALERO, A.; CARRASCO, E.; GARCÍA-GIMENO, R. M.; ZURERA, G. Evaluation of hygiene practices and microbiological quality of cooked meat products during slicing and handling at retail. **Meat Science**, v. 86, n. 2, p. 479–485, out. 2010. DOI [10.1016/j.meatsci.2010.05.038](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.038). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174010002238>. Acesso em: 14 mar. 2022.

PORTNOY, D. A.; CHAKRABORTY, T.; GOEBEL, W.; COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 4, p. 1263–1267, abr. 1992. DOI [10.1128/iai.60.4.1263-1267.1992](https://doi.org/10.1128/iai.60.4.1263-1267.1992). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.60.4.1263-1267.1992>. Acesso em: 8 mar. 2022.

POSSAS, A.; HERNÁNDEZ, M.; ESTEBAN-CARBONERO, Ó.; VALERO, A.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. *Listeria monocytogenes* survives better at lower storage temperatures in regular and low-salt soft and cured cheeses. **Food Microbiology**, v. 104, p. 103979, jun. 2022. DOI [10.1016/j.fm.2022.103979](https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.103979). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S074000202200003X>. Acesso em: 16 fev. 2022.

RADOSHEVICH, L.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 32–46, 1 jan. 2018. DOI [10.1038/nrmicro.2017.126](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.126). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.126>. Acesso em: 21 jan. 2022.

RAHN, W. M.; GOLLUST, S. E.; TANG, X. Framing Food Policy: The Case of Raw Milk: Framing Food Policy. **Policy Studies Journal**, v. 45, n. 2, p. 359–383, maio 2017. DOI [10.1111/psj.12161](https://doi.org/10.1111/psj.12161). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/psj.12161>. Acesso em: 3 mar. 2022.

REGUILLO, L.; HERNÁNDEZ, M.; BARRIENTOS, E.; PEREZ-RODRIGUEZ, F.; VALERO, A. Evaluation of the Influence of Frequency of Milk Collection and Milking Dayshift on the Microbiological Quality of Raw Milk. **Journal of Food**

Quality, v. 2018, p. 1306107, 21 maio 2018. DOI [10.1155/2018/1306107](https://doi.org/10.1155/2018/1306107). Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/1306107>. Acesso em: 31 jan. 2022

ROCOURT, J.; BOERLIN, P.; GRIMONT, F.; JACQUET, C.; PIFFARETTI, J.-C. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a Single Species, *Listeria grayi*, with a Revised Description of *Listeria grayi*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 1, p. 171–174, 1 jan. 1992. DOI [10.1099/00207713-42-1-171](https://doi.org/10.1099/00207713-42-1-171). Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-42-1-171>. Acesso em: 8 fev. 2022.

RODRIGUEZ, C.; TAMINIAU, B.; GARCÍA-FUENTES, E.; DAUBE, G.; KORSAK, N. *Listeria monocytogenes* dissemination in farming and primary production: Sources, shedding and control measures. **Food Control**, v. 120, p. 107540, 1 fev. 2021. DOI [10.1016/j.foodcont.2020.107540](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107540). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713520304564>. Acesso em: 18 fev. 2022.

RUUSUNEN, M.; SALONEN, M.; PULKKINEN, H.; HUUSKONEN, M.; HELLSTRÖM, S.; REVEZ, J.; HÄNNINEN, M.-L.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; LINDSTRÖM, M. Pathogenic Bacteria in Finnish Bulk Tank Milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 2, p. 99–106, fev. 2013. DOI [10.1089/fpd.2012.1284](https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1284). Disponível em: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2012.1284>. Acesso em: 15 mar. 2022.

SABET, C.; LECUIT, M.; CABANES, D.; COSSART, P.; BIERNE, H. LPXTG Protein InlJ, a Newly Identified Internalin Involved in *Listeria monocytogenes* Virulence. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6912–6922, out. 2005. DOI [10.1128/IAI.73.10.6912-6922.2005](https://doi.org/10.1128/IAI.73.10.6912-6922.2005). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.73.10.6912-6922.2005>. Acesso em: 14 mar. 2022.

SCHLECH, W. F.; LAVIGNE, P. M.; BORTOLUSSI, R. A.; ALLEN, A. C.; HALDANE, E. V.; WORT, A. J.; HIGHTOWER, A. W.; JOHNSON, S. E.; KING, S. H.; NICHOLLS, E. S.; BROOME, C. V. Epidemic Listeriosis — Evidence for Transmission by Food. **New England Journal of Medicine**, v. 308, n. 4, p. 203–206, 27 jan. 1983. DOI [10.1056/NEJM198301273080407](https://doi.org/10.1056/NEJM198301273080407). Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198301273080407>. Acesso em: 17 fev. 2022.

SCHODER, D.; MELZNER, D.; SCHMALWIESER, A.; ZANGANA, A.; WINTER, P.; WAGNER, M. Important Vectors for *Listeria monocytogenes* Transmission at Farm Dairies Manufacturing Fresh Sheep and Goat Cheese from Raw Milk. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 6, p. 919–924, 1 jun. 2011. DOI [10.4315/0362-028X.JFP-10-534](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-534). Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/74/6/919/173121/Important-Vectors-for-Listeria-monocytogenes>. Acesso em: 3 mar. 2022.

SOUZA, N. F. D.; PEREIRA, A. S. L.; SILVA, L. F.; CERQUEIRA-CÉZAR, C. K.; TADIELO, L. E.; PEREIRA, J. G. PRINCIPAIS ASPECTOS DE *Listeria monocytogenes* E SUA IMPORTÂNCIA PARA A SAÚDE PÚBLICA. **Ars Veterinaria**, v. 37, n. 4, p. 264–272, 22 dez. 2021. Disponível em: <http://www.arsveterinaria.org.br/ars/article/view/1436>. Acesso em: 24 mar. 2022.

THORNTON, B.; BASU, C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 39, n. 2, p. 145–154, 2011. DOI [10.1002/bmb.20461](https://doi.org/10.1002/bmb.20461). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bmb.20461>. Acesso em: 11 mar. 2022.

TOLEDO-ARANA, A.; DUSSURGET, O.; NIKITAS, G.; SESTO, N.; GUET-REVILLET, H.; BALESTRINO, D.; LOH, E.; GRIPENLAND, J.; TIENSUU, T.; VAITKEVICIUS, K.; BARTHELEMY, M.; VERGASSOLA, M.; NAHORI, M.-A.; SOUBIGOU, G.; RÉGNAULT, B.; COPPÉE, J.-Y.; LECUIT, M.; JOHANSSON, J.; COSSART, P. The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. **Nature**, v. 459, n. 7249, p. 950–956, jun. 2009. DOI [10.1038/nature08080](https://doi.org/10.1038/nature08080). Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature08080>. Acesso em: 14 mar. 2022.

VAN KESSEL, J. A. S.; KARNS, J. S.; LOMBARD, J. E.; KOPRAL, C. A. Prevalence of *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* Virulence Factors in Bulk Tank Milk and In-Line Filters from U.S. Dairies†. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 5, p. 759–768, 1 maio 2011. DOI [10.4315/0362-028X.JFP-10-423](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-423). Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/74/5/759/173453/Prevalence-of-Salmonella-enterica-Listeria>. Acesso em: 3 mar. 2022.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; STACHOWIAK, R.; LACHARME, L.; SCORTTI, M. Listeriolysin. In: ALOUF, J. E.; POPOFF, M. R. **The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins**. [S. l.]: Elsevier, 2006. Cap. 40, p. 700–716. DOI [10.1016/B978-012088445-2/50045-7](https://doi.org/10.1016/B978-012088445-2/50045-7). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780120884452500457>. Acesso em: 7 mar. 2022.

ZHANG, X.; LING, L.; LI, Z.; WANG, J. Mining *Listeria monocytogenes* single nucleotide polymorphism sites to identify the major serotypes using allele-specific multiplex PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 335, p. 108885, dez. 2020. DOI [10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108885](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108885). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160520303792>. Acesso em: 16 fev. 2022.

WINTER, P.; SCHILCHER, F.; BAGO, Z.; SCHODER, D.; EGERBACHER, M.; BAUMGARTNER, W.; WAGNER, M. Clinical and Histopathological Aspects of Naturally Occurring Mastitis Caused by *Listeria monocytogenes* in Cattle and Ewes. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 51, n. 4, p. 176–179, maio 2004. DOI [10.1111/j.1439-0450.2004.00751.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00751.x). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0450.2004.00751.x>. Acesso em: 18 fev. 2022.

WHITMAN, K. J.; BONO, J. L.; CLAWSON, M. L.; LOY, J. D.; BOSILEVAC, J. M.; ARTHUR, T. M.; ONDRAK, J. D. Genomic-based identification of environmental and clinical *Listeria monocytogenes* strains associated with an abortion outbreak in beef heifers. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 70, 22 fev. 2020. DOI [10.1186/s12917-020-2276-z](https://doi.org/10.1186/s12917-020-2276-z). Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12917-020-2276-z>. Acesso em: 18 fev. 2022.

WILKING, H. Healthcare-associated foodborne outbreaks in high-income countries: a literature review and surveillance study, 16 OECD countries, 2001 to 2019*. **Eurosurveillance**, [s. l.], v. 26, n. 41, p. 2001278, 2021. Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.41.2001278>. Acesso em: 12 jan. 2022.

WILLIS, C.; JØRGENSEN, F.; AIRD, H.; ELVISS, N.; FOX, A.; JENKINS, C.; FENELON, D.; SADLER-REEVES, L.; MCLAUCHLIN, J. An assessment of the microbiological quality and safety of raw drinking milk on retail sale in England. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, n. 2, p. 535–546, fev. 2018. DOI [10.1111/jam.13660](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jam.13660). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jam.13660>. Acesso em: 7 mar. 2022.

WINTER, P.; SCHILCHER, F.; BAGO, Z.; SCHODER, D.; EGERBACHER, M.; BAUMGARTNER, W.; WAGNER, M. Clinical and Histopathological Aspects of Naturally Occurring Mastitis Caused by *Listeria monocytogenes* in Cattle and Ewes. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 51, n. 4, p. 176–179, maio 2004. DOI [10.1111/j.1439-0450.2004.00751.x](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0450.2004.00751.x). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0450.2004.00751.x>. Acesso em: 18 fev. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Estimating the burden of foodborne diseases. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/activities/estimating-the-burden-of-foodborne-diseases>. Acesso em: 14 mar. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Estimating the Burden of Foodborne Diseases: a practical handbook for countries: a guide for planning**, implementing and reporting country-level burden of foodborne disease. Geneva: World Health Organization, 2021. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/341634>. Acesso em: 12 jan. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015**. Geneva, 2015. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/199350>. Acesso em: 12 jan. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2018 South Africa. Geneva, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/02-may-2018-listeriosis-south-africa-en>. Acesso em: 28 jan. 2022.

WU, S. Invasion. In: TANG, Y. W. et al. (ed.). **Molecular Medical Microbiology**. [S. l.]: Elsevier, 2015. v. 1, cap. 25, p. 423–448. DOI [10.1016/B978-0-12-397169-2.00025-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00025-1). Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123971692000251>. Acesso em: 21 fev. 2022.

ZAR, J.H. ***Bioestatistical analysis***, 5ed. New Jersey: Prentice – Hall, 2010. 994p

ANEXOS

ANEXO 1: Certificado de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, São Paulo (CEUA/FMVZ/Unesp)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



ATESTADO

Atesto que o Projeto "ANÁLISE ESPACIAL E AVALIAÇÃO MOLECULAR DE *Listeria monocytogenes* EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO PROCEDENTES DE TANQUES DE RESFRIAMENTO DE PEQUENAS PROPRIEDADES DO CENTRO-OESTE PAULISTA" **Protocolo CEUA 0018/2021**, a ser conduzido por Jackieeline Sampaio Steinle, responsável/orientador Simone Baldini Lucheis, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	17/02/2021 a 03/08/2022

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 17/02/2021

JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2176 - patricia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br

ANEXO 2: Protocolo de extração das amostras de leite com o Kit comercial *Illustra Blood GenomicPrep* (GE Healthcare®).

1. Em um microtubo de 1,5 mL, adicionar 900µL da amostra de leite.
2. Centrifugar a 14.000g por 2 minutos.
3. Eliminar o sobrenadante por inversão, deixando o pellet. Retirar a gordura da parede do tubo com swab estéril (individual)
4. Adicionar ao pellet 40 µL de tampão de lisozima e misturar imediatamente em vórtex.
5. Adicionar 10 µL de lisozima (10mg/mL) e misturar em vórtex.
6. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos, agitando-se ocasionalmente.
7. Adicionar 10 µL da proteinase K (20mg/mL) e agitar em vórtex.
8. Incubar a 56°C por 15 a 30 minutos, agitando-se ocasionalmente
9. Prosseguir com a adição de 400 µL da Lysis Solution no microtubo. Homogeneize bem com vórtex por 15 segundos.
10. Incube o microtubo em temperatura ambiente por 10 minutos com homogeneização intermitente para lise adicional.
11. Centrifugue rapidamente a 5000 g (rcf) por 1 minuto (ou 7000 rpm em 1 minuto) para levar as amostras para baixo.
12. Monte uma mini-coluna sobre o tubo de coleta fornecido. Use colunas individuais para amostras individuais. Estas colunas são descartáveis.
13. Abra a tampa da coluna e transfira o lisado completo (450 µL) para a coluna usando a micropipeta.
14. Feche a tampa da coluna e transfira-a para uma microcentrífuga. Centrifugue a 11.000g por 1 minuto (ou a 10.400 rpm por 1 minuto).

15. Remova o tubo da coleta contendo o líquido cuidadosamente, sem tocar a base da coluna. Descarte esse líquido.
16. Adicione 500 µL da Lysis Solution na coluna e centrifugue a 11.000g por 1 minuto. Este passo adicional garante a completa lise das células e desnatura qualquer proteína residual.
17. Descarte o líquido.
18. Adicione 500 µL de Wash Buffer à coluna e centrifugue a 11.000g por 3 minutos.
19. Descarte o tubo de coleta com o líquido.

Importante: não deve sobrar nenhuma solução de lavagem (etanólica) na coluna. Se isso ocorrer, descarte o líquido da coluna e centrifugue por mais 1 minuto. O DNA preso à matriz de sílica está altamente puro e agora pronto para eluição.

20. Transfira a coluna de purificação para um microtubo novo.
21. Adicione 200 µL do Elution buffer (tampão de eluição) pré-aquecido a 70°C diretamente na coluna.
22. Incube a coluna por 1 minuto em temperatura ambiente.
23. Centrifugue a 11.000g por 1 minuto para recuperar o DNA.
24. O DNA eluído está pronto para as aplicações seguintes. Armazenar a -20°C.

ANEXO 3: Quantificação de DNA a partir da extração das amostras de leite de tanque de expansão.

AMOSTRAS	RELAÇÃO 260/280	DNA AMOSTRA (ng/ul)
1	1.637	12.0
2	2.214	4.7
3	1.148	3.5
4	1.811	4.8
5	2.750	3.9
6	1.348	6.2
7	1.791	9.9
8	2.130	5.8
9	1.418	6.5
10	1.324	11.9
11	1.336	17.5
12	1.824	15.5
13	1.860	14.0
14	1.632	9.3
15	1.568	6.9
16	0.545	42.0
17	1.261	7.3
18	1.753	9.1
19	1.457	59.0
20	1.358	22.0
21	2.295	5.1
22	1.492	47.0
23	1.794	56.5
24	1.318	7.3
25	1.676	62.0
26	1.320	13.4
27	1.600	48.0
28	1.248	88.0
29	2.196	5.1
30	1.413	7.3

31	2.365	6.2
32	1.676	3.1
33	1.511	3.4
34	2.579	4.9
35	1.906	8.1
36	1.526	2.9
37	1.403	5.4
38	1.863	19.0
39	1.729	4.2
40	1.775	7.1
41	1.212	4.9
42	1.788	3.0
43	1.397	4.8
44	1.479	7.0
45	1.932	8.5
46	1.720	4.3
47	1.696	4.8
48	1.338	9.1
49	1.258	5.6
50	1.271	6.1
51	1.400	3.9
52	2.000	3.5
53	1.929	4.1
54	1.775	3.6
55	2.034	5.9
56	1.588	8.1
57	1.598	9.8
58	1.614	8.2
59	1.074	12.4
60	1.548	4.8
61	1.566	6.5
62	1.442	9.3
63	1.651	10.7
64	1.594	2.6

65	1.417	4.2
66	1.315	5.9
67	1.263	6.2
68	1.456	7.5
69	1.427	7.9
70	0.902	23.0
71	1.288	11.4
72	1.426	9.7
73	1.570	6.2
74	1.223	11.5
75	1.211	4.3
76	1.430	5.7
77	1.769	5.8
78	1.041	6.3
79	2.157	7.6
80	1.625	2.6
81	1.747	6.9
82	1.714	3.0
83	1.811	4.8
84	1.822	8.2
85	1.471	7.5
86	1.750	4.2
87	3.368	3.2
88	4.111	1.9
89	1.647	2.8
90	1.925	6.5
91	2.056	3.7
92	1.967	3.0
93	1.766	4.2
94	1.091	12.6
95	2.157	8.9
96	2.375	1.0
97	1.381	1.5
98	2.100	1.6

99	2.161	3.4
100	2.077	2.7
101	1.132	3.9
102	1.934	5.9

ANEXO 4:

Figura 6: Gel de agarose a 2% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (linha 1). Amostras de leite bovino. Amostras 05, 10, 11, 12 e 17 amplificaram ao teste com o gene *prs* codificador de fragmento de 370 pb de *Listeria spp.* Controle positivo (linha 23): *L. monocytogenes* ATCC 7644, Controle negativo (linha 24): água ultrapura.



FONTE: arquivo pessoal.

Figura 7: Gel de agarose a 2% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (linha 1). Amostras de leite bovino. Amostras 23, 24, 25, 33, 37 e 38 amplificaram ao teste com o gene *prs* codificador de fragmento de 370 pb de *Listeria spp.* Controle positivo (linha 23): *L. monocytogenes* ATCC 7644; Controle negativo (linha 24): água ultrapura.



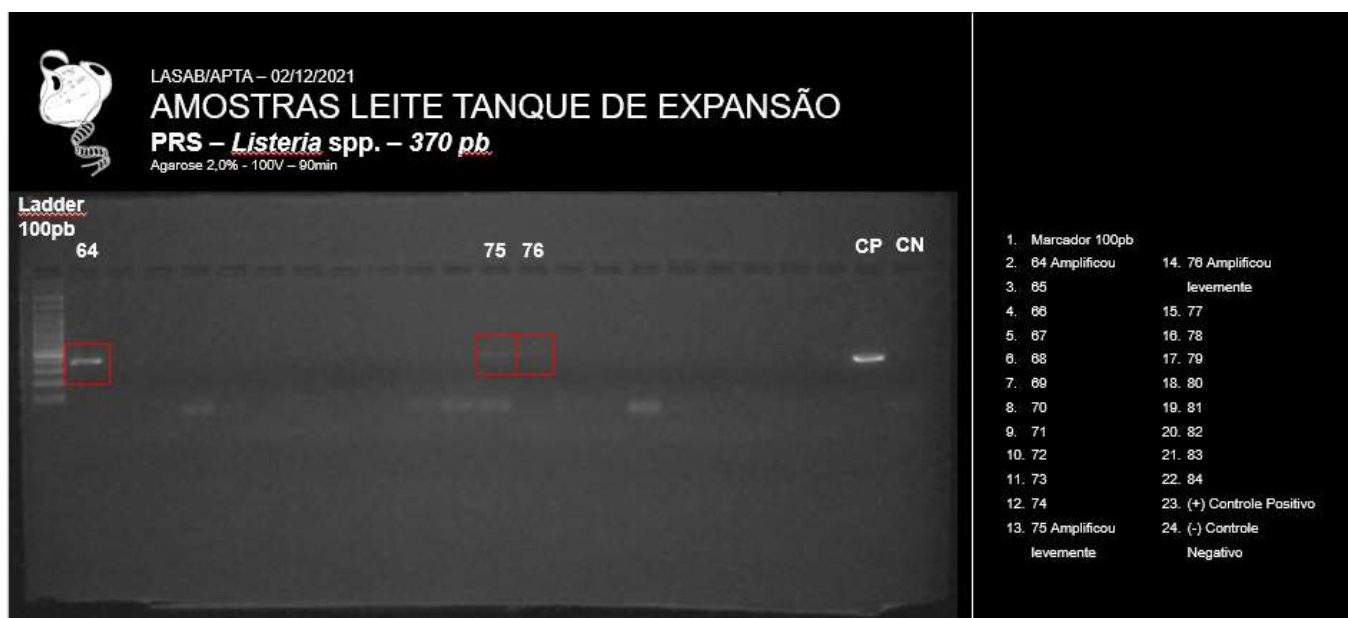
FONTE: arquivo pessoal.

Figura 8: Gel de agarose a 2% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (linha 1). Amostras de leite bovino. Amostra 43 amplificou ao teste com o gene *prs* codificador de fragmento de 370 pb de *Listeria* spp. Controle positivo (linha 23): *L. monocytogenes* ATCC 7644, Controle negativo (linha 24): água ultrapura.



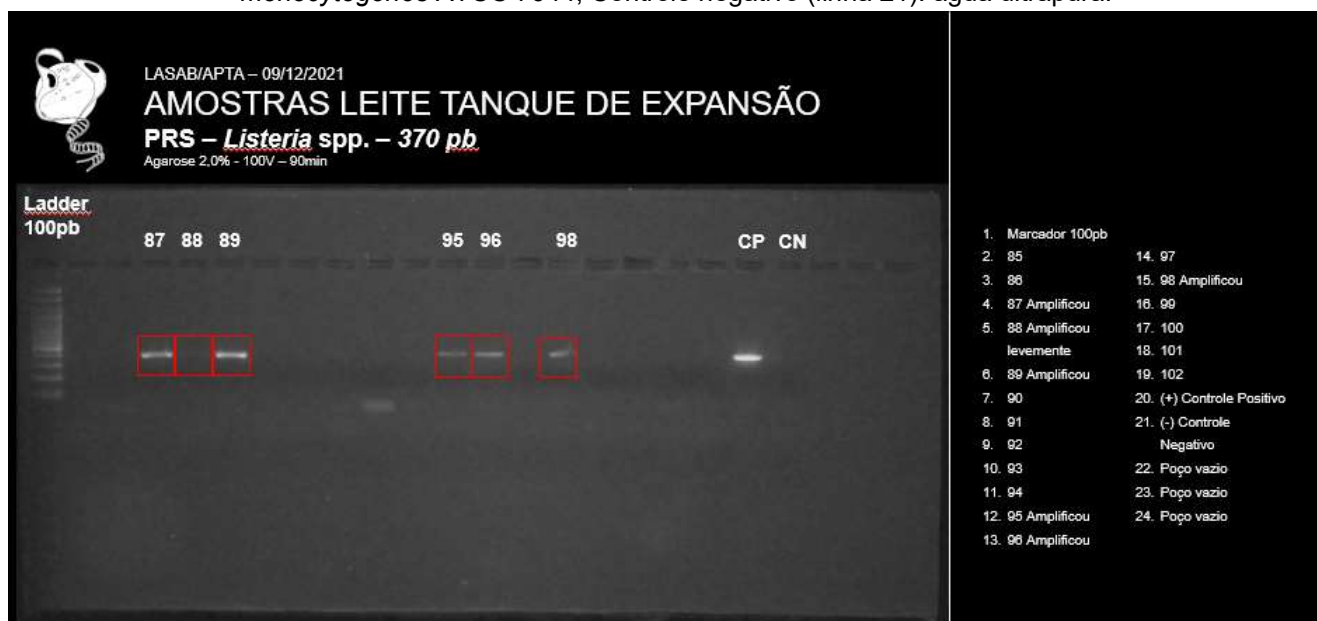
FONTE: arquivo pessoal.

Figura 9: Gel de agarose a 2% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (linha 1). Amostras de leite bovino. Amostras 64, 75 e 76 amplificaram ao teste com o gene *prs* codificador de fragmento de 370 pb de *Listeria* spp. Controle positivo (linha 23): *L. monocytogenes* ATCC 7644 Controle negativo (linha 24): água ultrapura.



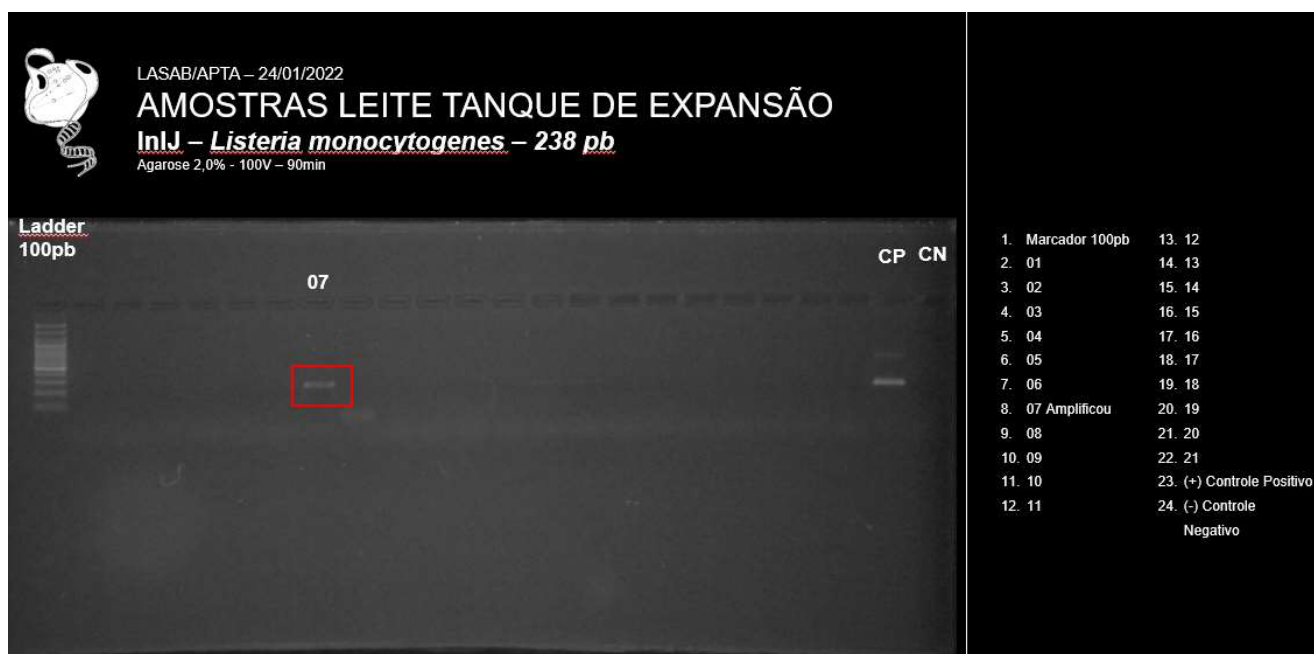
FONTE: arquivo pessoal.

Figura 10: Gel de agarose a 2% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (linha 1). Amostras de leite bovino. Amostras 87, 88, 89, 95, 96 e 98 amplificaram ao teste com o gene *prs* codificador de fragmento de 370 pb de *Listeria* spp. Controle positivo (linha 20): *L. monocytogenes* ATCC 7644, Controle negativo (linha 21): água ultrapura.



FONTE: arquivo pessoal.

Figura 11: Gel de agarose a 2% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (linha 1). Amostras de leite bovino. Amostra 07 amplificou ao teste com o gene *inlJ* codificador de fragmento de 238 pb de *L. monocytogenes* Controle positivo (linha 23): *L. monocytogenes* ATCC 7644; Controle negativo (linha 24): água ultrapura.



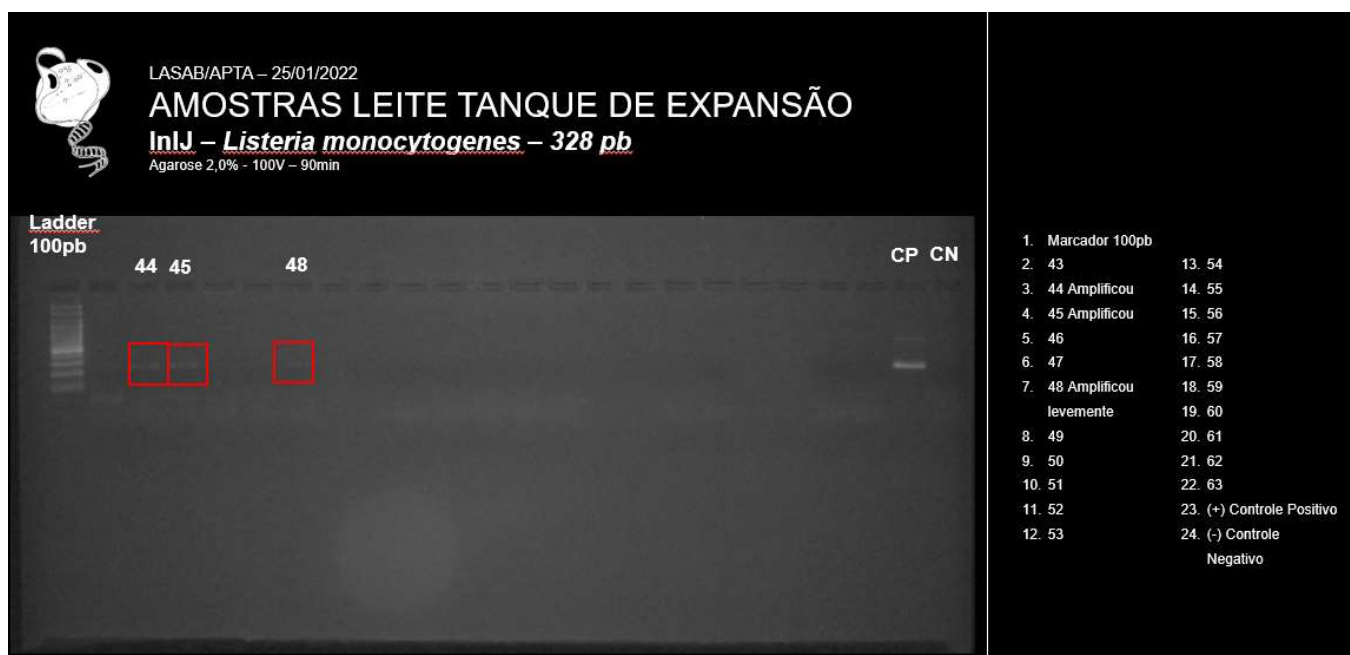
FONTE: arquivo pessoal.

Figura 12: Gel de agarose a 2% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (linha 1). Amostras de leite bovino. Amostras 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 36 amplificaram ao teste com o gene *inlJ* codificador de fragmento de 238 pb de *L. monocytogenes* Controle positivo (linha 23): *L. monocytogenes* ATCC 7644, Controle negativo (linha 24): água ultrapura.



FONTE: arquivo pessoal.

Figura 13: Gel de agarose a 2% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (linha 1). Amostras de leite bovino. Amostras 44, 45 e 48 amplificaram ao teste com o gene *inlJ* codificador de fragmento de 328 pb de *L. monocytogenes* Controle positivo (linha 23): *L. monocytogenes* ATCC 7644; Controle negativo (linha 24): água ultrapura.



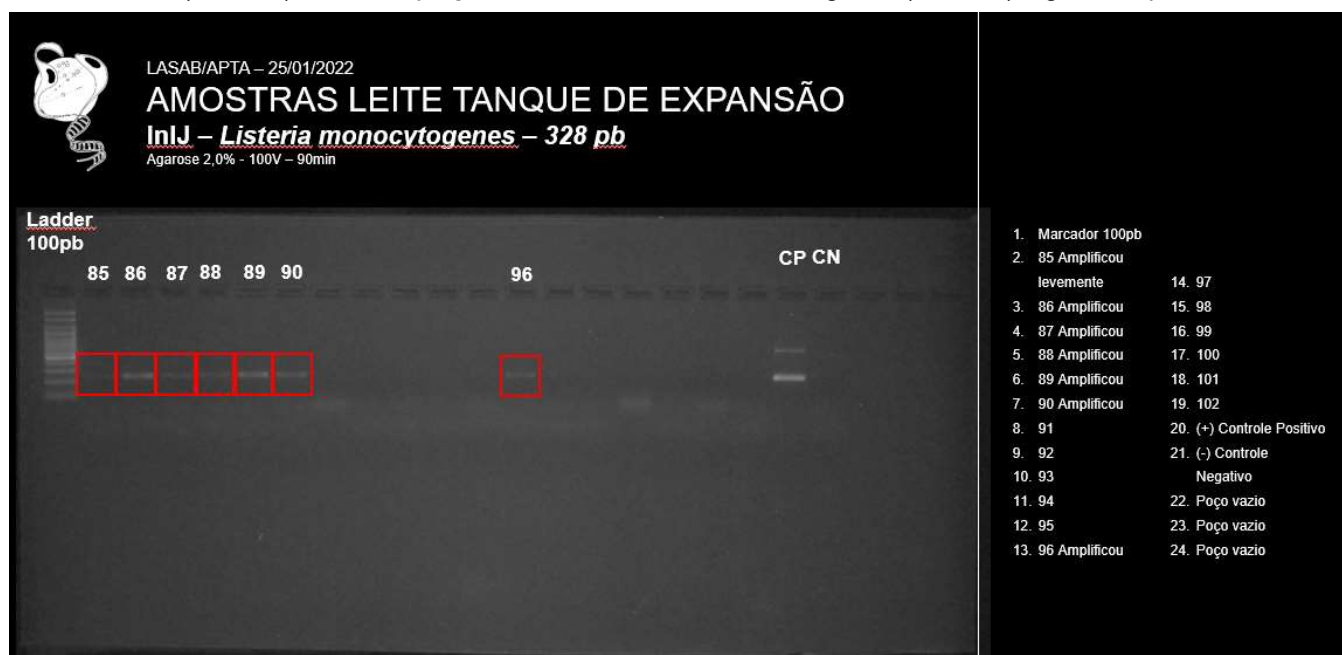
FONTE: arquivo pessoal.

Figura 14: Gel de agarose a 2% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (linha 1). Amostras de leite bovino. Amostra 68 amplificou ao teste com o gene *inlJ* codificador de fragmento de 238 pb de *L. monocytogenes* Controle positivo (linha 23): *L. monocytogenes* ATCC 7644, Controle negativo (linha 24): água ultrapura.



FONTE: arquivo pessoal.

Figura 15: Gel de agarose a 2% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (linha 1). Amostras de leite bovino. Amostras 85, 86, 87, 88, 89, 90 e 96 amplificaram ao teste com o gene *inlJ* codificador de fragmento de 328 pb de *L. monocytogenes*. Controle positivo (linha 20): *L. monocytogenes* ATCC 7644, Controle negativo (linha 21): água ultrapura.



FONTE: arquivo pessoal.

Figura 16: Gel de agarose a 2% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (linha 1). Amostras de leite bovino. Amostra 07 amplificou ao teste com o gene *inlC* codificador de fragmento de 517 pb de *L. monocytogenes* Controle positivo (linha 23): *L. monocytogenes* ATCC 7644; Controle negativo (linha 24): água ultrapura.



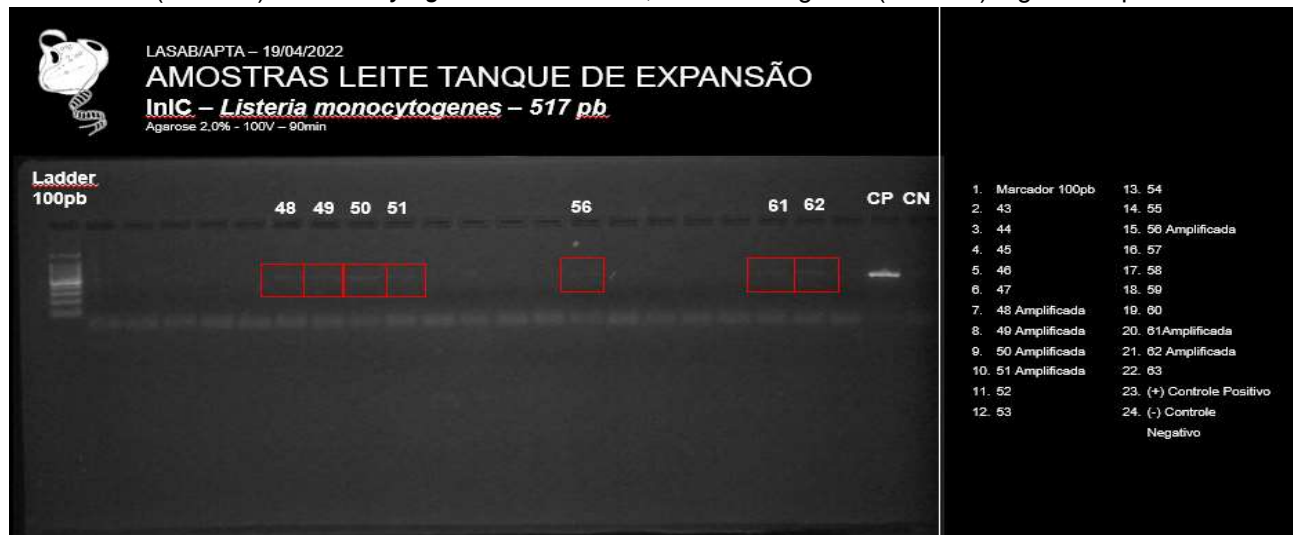
FONTE: arquivo pessoal.

Figura 17: Gel de agarose a 2% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (linha 1). Amostras de leite bovino. Amostra 32 amplificou ao teste com o gene *inlC* codificador de fragmento de 517 pb de *L. monocytogenes* Controle positivo (linha 23): *L. monocytogenes* ATCC 7644; Controle negativo (linha 24): água ultrapura.



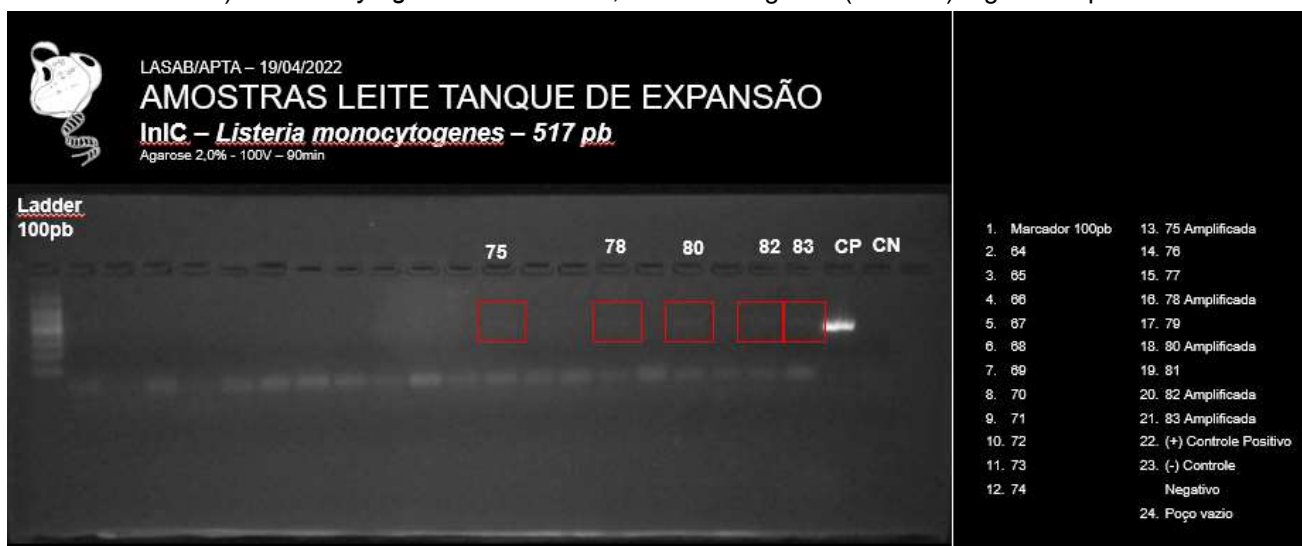
FONTE: arquivo pessoal.

Figura 18: Gel de agarose a 2% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (linha 1). Amostras de leite bovino. Amostras 48, 49, 50, 51, 56, 61 e 62 amplificaram ao teste com o gene *inlC* codificador de fragmento de 517 pb de *L. monocytogenes*. Controle positivo (linha 23): *L. monocytogenes* ATCC 7644; Controle negativo (linha 24): água ultrapura.



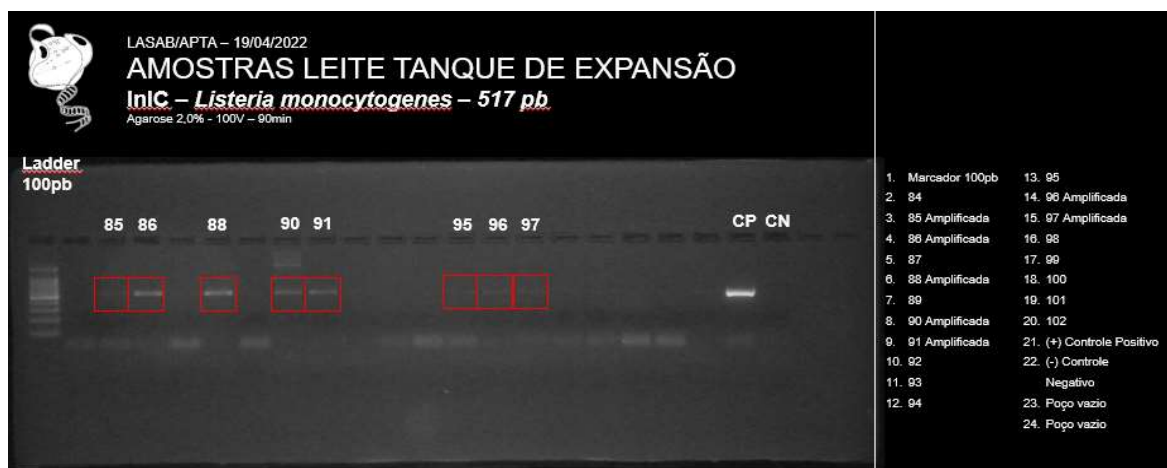
FONTE: arquivo pessoal.

Figura 19: Gel de agarose a 2% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (linha 1). Amostras de leite bovino. Amostras 75, 78, 80, 82 e 83 amplificaram ao teste com o gene *inlC* codificador de fragmento de 517 pb de *L. monocytogenes*. Controle positivo (linha 22): *L. monocytogenes* ATCC 7644, Controle negativo (linha 23): água ultrapura.



FONTE: arquivo pessoal.

Figura 20: Gel de agarose a 2% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb (linha 1). Amostras de leite bovino. Amostras 85, 86, 88, 90, 91, 95, 96 e 97 amplificaram ao teste com o gene *inlC* codificador de fragmento de 517 pb de *L. monocytogenes*. Controle positivo (linha 21): *L. monocytogenes* ATCC 7644, Controle negativo (linha 22): água ultrapura.



FONTE: arquivo pessoal.

ANEXO 5: Resultados no BLAST

Primer inIJ (gene *Imo2821*)

Amostra 07: cepa detectada e número de acesso.

Sequences producing significant alignments									
Download ▼ New Select columns ▼ Show 100 ▼ ?									
☒ select all 100 sequences selected	GenBank Graphics Distance tree of results New MSA Viewer								
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Listeria monocytogenes strain BfR-LI-00752 chromosome	Listeria monocytogenes	350	350	99%	4e-92	100.00%	3020043	CP054846.1
☒	Listeria monocytogenes strain PNUSAL000019 chromosome	Listeria monocytogenes	350	350	99%	4e-92	100.00%	2906751	CP054040.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB040119 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	350	350	99%	4e-92	100.00%	2953956	CP053630.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB030029 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	350	350	99%	4e-92	100.00%	2994628	CP053628.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB050226 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	350	350	99%	4e-92	100.00%	2953451	CP053632.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB020621 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	350	350	99%	4e-92	100.00%	2949231	CP053478.1
☒	Listeria monocytogenes strain 2017-TE-6913-1 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	350	350	99%	4e-92	100.00%	2953624	CP053357.1
☒	Listeria monocytogenes strain FDA00008248 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	350	350	99%	4e-92	100.00%	2967487	CP043177.2

Amostra 22: cepa detectada e número de acesso.

Sequences producing significant alignments									
Download ▼ New Select columns ▼ Show 100 ▼ ?									
☒ select all 100 sequences selected	GenBank Graphics Distance tree of results New MSA Viewer								
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Listeria monocytogenes strain BfR-LI-00752 chromosome	Listeria monocytogenes	339	339	98%	9e-89	100.00%	3020043	CP054846.1
☒	Listeria monocytogenes strain PNUSAL000019 chromosome	Listeria monocytogenes	339	339	98%	9e-89	100.00%	2906751	CP054040.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB040119 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	339	339	98%	9e-89	100.00%	2953956	CP053630.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB030029 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	339	339	98%	9e-89	100.00%	2994628	CP053628.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB050226 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	339	339	98%	9e-89	100.00%	2953451	CP053632.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB020621 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	339	339	98%	9e-89	100.00%	2949231	CP053478.1
☒	Listeria monocytogenes strain 2017-TE-6913-1 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	339	339	98%	9e-89	100.00%	2953624	CP053357.1
☒	Listeria monocytogenes strain FDA00008248 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	339	339	98%	9e-89	100.00%	2967487	CP043177.2

Amostra 26: cepa detectada e número de acesso.

Sequences producing significant alignments									
Download ▼ New Select columns ▼ Show 100 ▼ ?									
☒ select all 100 sequences selected	GenBank Graphics Distance tree of results New MSA Viewer								
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Listeria monocytogenes strain BfR-LI-00752 chromosome	Listeria monocytogenes	342	342	98%	7e-90	98.96%	3020043	CP054846.1
☒	Listeria monocytogenes strain PNUSAL000019 chromosome	Listeria monocytogenes	342	342	98%	7e-90	98.96%	2906751	CP054040.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB040119 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	342	342	98%	7e-90	98.96%	2953956	CP053630.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB030029 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	342	342	98%	7e-90	98.96%	2994628	CP053628.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB050226 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	342	342	98%	7e-90	98.96%	2953451	CP053632.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB020621 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	342	342	98%	7e-90	98.96%	2949231	CP053478.1
☒	Listeria monocytogenes strain 2017-TE-6913-1 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	342	342	98%	7e-90	98.96%	2953624	CP053357.1
☒	Listeria monocytogenes strain FDA00008248 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	342	342	98%	7e-90	98.96%	2967487	CP043177.2

Amostra 36: cepa detectada e número de acesso.

Sequences producing significant alignments									
Download ▼ New Select columns ▼ Show 100 ▼ ?									
☒ select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results New MSA Viewer									
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Listeria monocytogenes strain BFR-LI-00752 chromosome	Listeria monocytogenes	348	348	99%	1e-91	100.00%	3020043	CP054846.1
☒	Listeria monocytogenes strain PNUSAL000019 chromosome	Listeria monocytogenes	348	348	99%	1e-91	100.00%	2906751	CP054040.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB040119 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	348	348	99%	1e-91	100.00%	2953956	CP053630.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB030029 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	348	348	99%	1e-91	100.00%	2994628	CP053628.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB050226 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	348	348	99%	1e-91	100.00%	2953451	CP053632.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB020621 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	348	348	99%	1e-91	100.00%	2949231	CP053478.1
☒	Listeria monocytogenes strain 2017-TE-6913-1 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	348	348	99%	1e-91	100.00%	2953624	CP053357.1
☒	Listeria monocytogenes strain FDA00008248 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	348	348	99%	1e-91	100.00%	2967487	CP043177.2

Amostra 44: cepa detectada e número de acesso.

Sequences producing significant alignments									
Download ▼ New Select columns ▼ Show 100 ▼ ?									
☒ select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results New MSA Viewer									
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Listeria monocytogenes strain BFR-LI-00752 chromosome	Listeria monocytogenes	355	355	99%	9e-94	100.00%	3020043	CP054846.1
☒	Listeria monocytogenes strain PNUSAL000019 chromosome	Listeria monocytogenes	355	355	99%	9e-94	100.00%	2906751	CP054040.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB040119 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	355	355	99%	9e-94	100.00%	2953956	CP053630.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB030029 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	355	355	99%	9e-94	100.00%	2994628	CP053628.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB050226 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	355	355	99%	9e-94	100.00%	2953451	CP053632.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB020621 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	355	355	99%	9e-94	100.00%	2949231	CP053478.1
☒	Listeria monocytogenes strain 2017-TE-6913-1 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	355	355	99%	9e-94	100.00%	2953624	CP053357.1
☒	Listeria monocytogenes strain FDA00008248 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	355	355	99%	9e-94	100.00%	2967487	CP043177.2

Amostra 45: cepa detectada e número de acesso.

Sequences producing significant alignments									
Download ▼ New Select columns ▼ Show 100 ▼ ?									
☒ select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results New MSA Viewer									
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Listeria monocytogenes strain BFR-LI-00752 chromosome	Listeria monocytogenes	348	348	99%	1e-91	100.00%	3020043	CP054846.1
☒	Listeria monocytogenes strain PNUSAL000019 chromosome	Listeria monocytogenes	348	348	99%	1e-91	100.00%	2906751	CP054040.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB040119 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	348	348	99%	1e-91	100.00%	2953956	CP053630.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB030029 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	348	348	99%	1e-91	100.00%	2994628	CP053628.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB050226 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	348	348	99%	1e-91	100.00%	2953451	CP053632.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB020621 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	348	348	99%	1e-91	100.00%	2949231	CP053478.1
☒	Listeria monocytogenes strain 2017-TE-6913-1 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	348	348	99%	1e-91	100.00%	2953624	CP053357.1
☒	Listeria monocytogenes strain FDA00008248 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	348	348	99%	1e-91	100.00%	2967487	CP043177.2

Amostra 86: cepa detectada e número de acesso.

Sequences producing significant alignments									
Download ▼ New Select columns ▼ Show 100 ▼ ?									
☒ select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results New MSA Viewer									
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Listeria monocytogenes strain BIR-LI-00752 chromosome	Listeria monocytogenes	355	355	99%	9e-94	100.00%	3020043	CP054846.1
☒	Listeria monocytogenes strain PNUSAL000019 chromosome	Listeria monocytogenes	355	355	99%	9e-94	100.00%	2906751	CP054040.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB040119 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	355	355	99%	9e-94	100.00%	2953956	CP053630.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB030029 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	355	355	99%	9e-94	100.00%	2994628	CP053628.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB050226 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	355	355	99%	9e-94	100.00%	2953451	CP053632.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB020621 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	355	355	99%	9e-94	100.00%	2949231	CP053478.1
☒	Listeria monocytogenes strain 2017-TE-6913-1 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	355	355	99%	9e-94	100.00%	2953624	CP053357.1
☒	Listeria monocytogenes strain FDA00008248 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	355	355	99%	9e-94	100.00%	2967487	CP043177.2

Amostra 88: cepa detectada e número de acesso.

Sequences producing significant alignments									
Download ▼ New Select columns ▼ Show 100 ▼ ?									
☒ select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results New MSA Viewer									
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Listeria monocytogenes strain BIR-LI-00752 chromosome	Listeria monocytogenes	350	350	98%	4e-92	100.00%	3020043	CP054846.1
☒	Listeria monocytogenes strain PNUSAL000019 chromosome	Listeria monocytogenes	350	350	98%	4e-92	100.00%	2906751	CP054040.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB040119 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	350	350	98%	4e-92	100.00%	2953956	CP053630.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB030029 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	350	350	98%	4e-92	100.00%	2994628	CP053628.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB050226 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	350	350	98%	4e-92	100.00%	2953451	CP053632.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB020621 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	350	350	98%	4e-92	100.00%	2949231	CP053478.1
☒	Listeria monocytogenes strain 2017-TE-6913-1 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	350	350	98%	4e-92	100.00%	2953624	CP053357.1
☒	Listeria monocytogenes strain FDA00008248 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	350	350	98%	4e-92	100.00%	2967487	CP043177.2

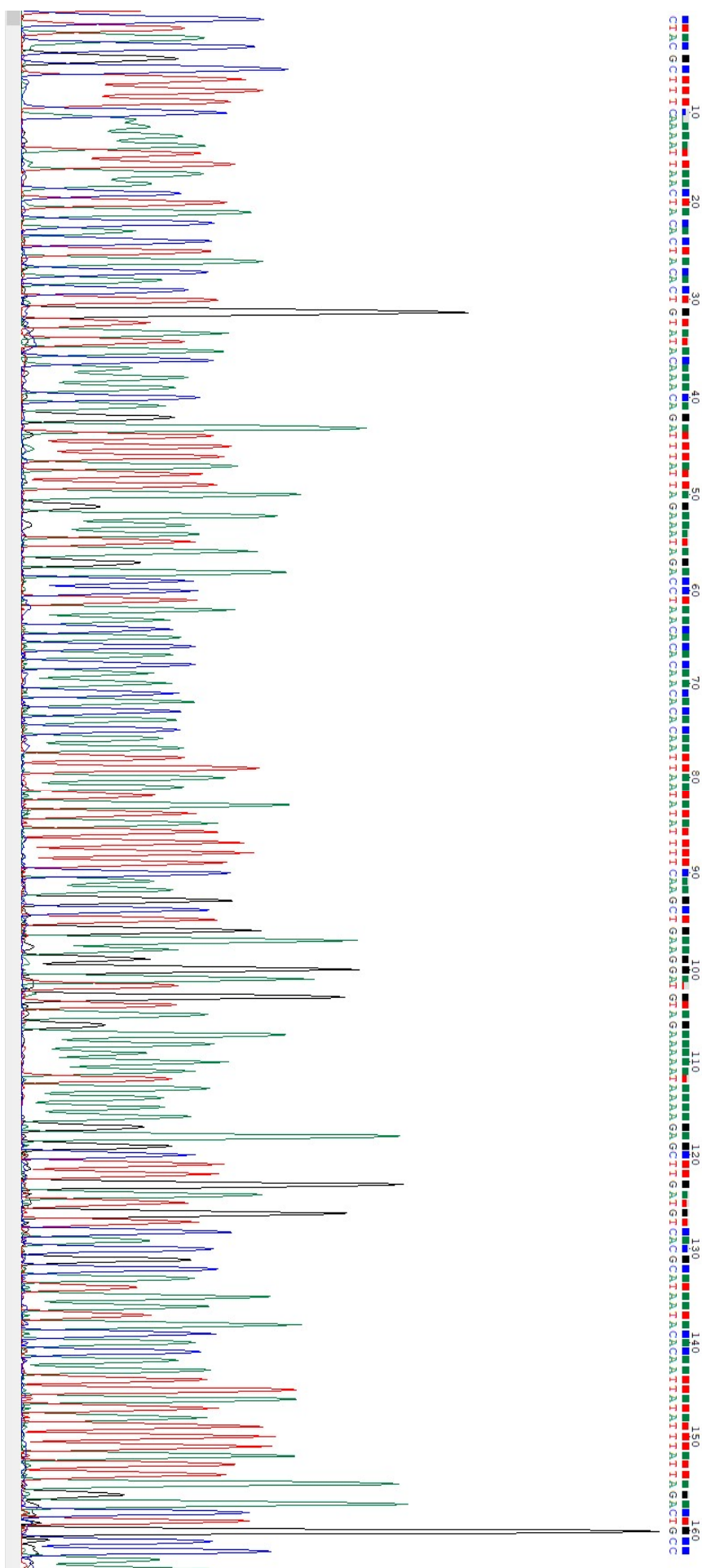
Amostra 90: cepa detectada e número de acesso.

Sequences producing significant alignments									
Download ▼ New Select columns ▼ Show 100 ▼ ?									
☒ select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results New MSA Viewer									
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Listeria monocytogenes strain BIR-LI-00752 chromosome	Listeria monocytogenes	350	350	95%	4e-92	100.00%	3020043	CP054846.1
☒	Listeria monocytogenes strain PNUSAL000019 chromosome	Listeria monocytogenes	350	350	95%	4e-92	100.00%	2906751	CP054040.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB040119 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	350	350	95%	4e-92	100.00%	2953956	CP053630.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB030029 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	350	350	95%	4e-92	100.00%	2994628	CP053628.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB050226 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	350	350	95%	4e-92	100.00%	2953451	CP053632.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB020621 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	350	350	95%	4e-92	100.00%	2949231	CP053478.1
☒	Listeria monocytogenes strain 2017-TE-6913-1 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	350	350	95%	4e-92	100.00%	2953624	CP053357.1
☒	Listeria monocytogenes strain FDA00008248 chromosome .complete genome	Listeria monocytogenes	350	350	95%	4e-92	100.00%	2967487	CP043177.2

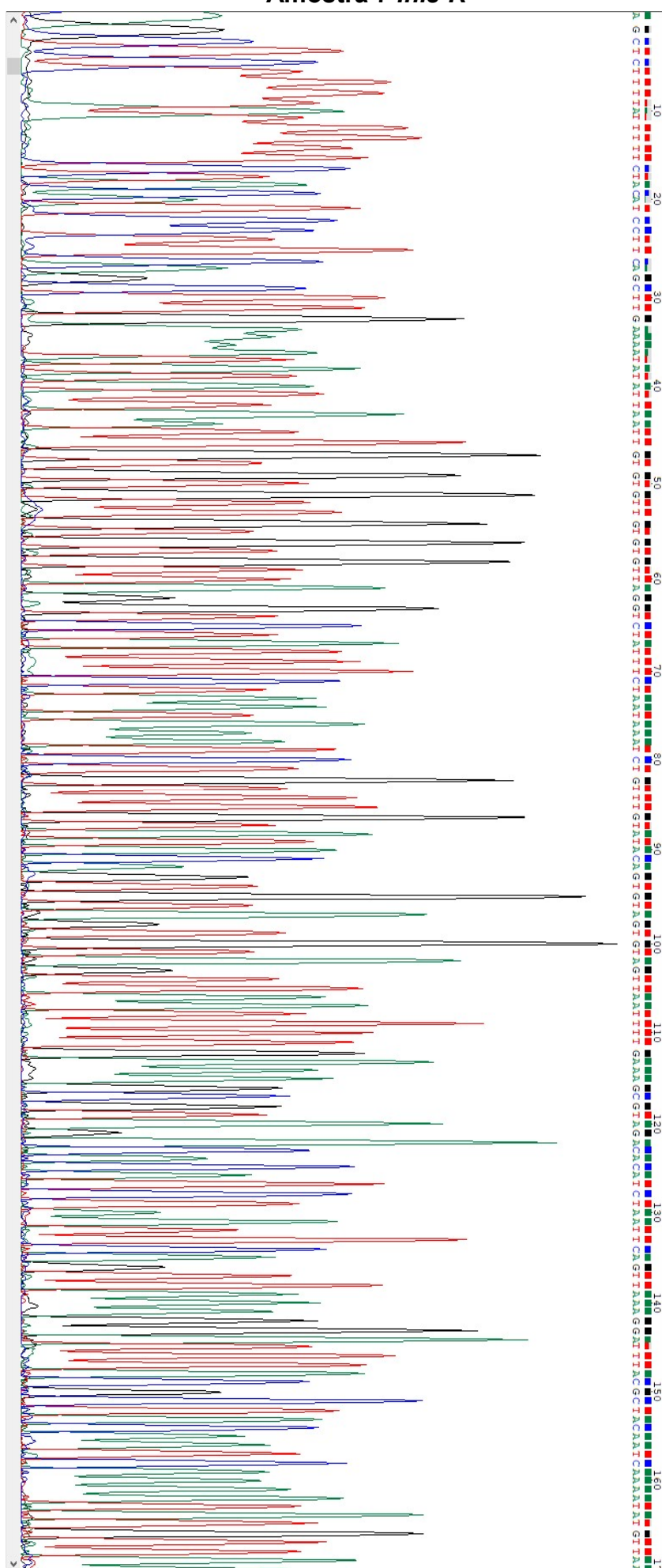
Amostra 91: cepa detectada e número de acesso.

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 100 sequences selected									
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident.	Acc. Len	Accession
☒	Listeria monocytogenes strain PNUSAL000019 chromosome	Listeria monocytogenes	846	846	100%	0.0	100.00%	2906751	CP054040.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB040119 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	846	846	100%	0.0	100.00%	2953956	CP053630.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB030029 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	846	846	100%	0.0	100.00%	2994628	CP053628.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB050226 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	846	846	100%	0.0	100.00%	2953451	CP053632.1
☒	Listeria monocytogenes strain OB020621 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	846	846	100%	0.0	100.00%	2949231	CP053478.1
☒	Listeria monocytogenes strain 2017-TE-6913-1 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	846	846	100%	0.0	100.00%	2953624	CP053357.1
☒	Listeria monocytogenes strain FDA00009448 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	846	846	100%	0.0	100.00%	3001785	CP044432.2
☒	Listeria monocytogenes strain FDA00006667 chromosome complete genome	Listeria monocytogenes	846	846	100%	0.0	100.00%	2953686	CP044430.2

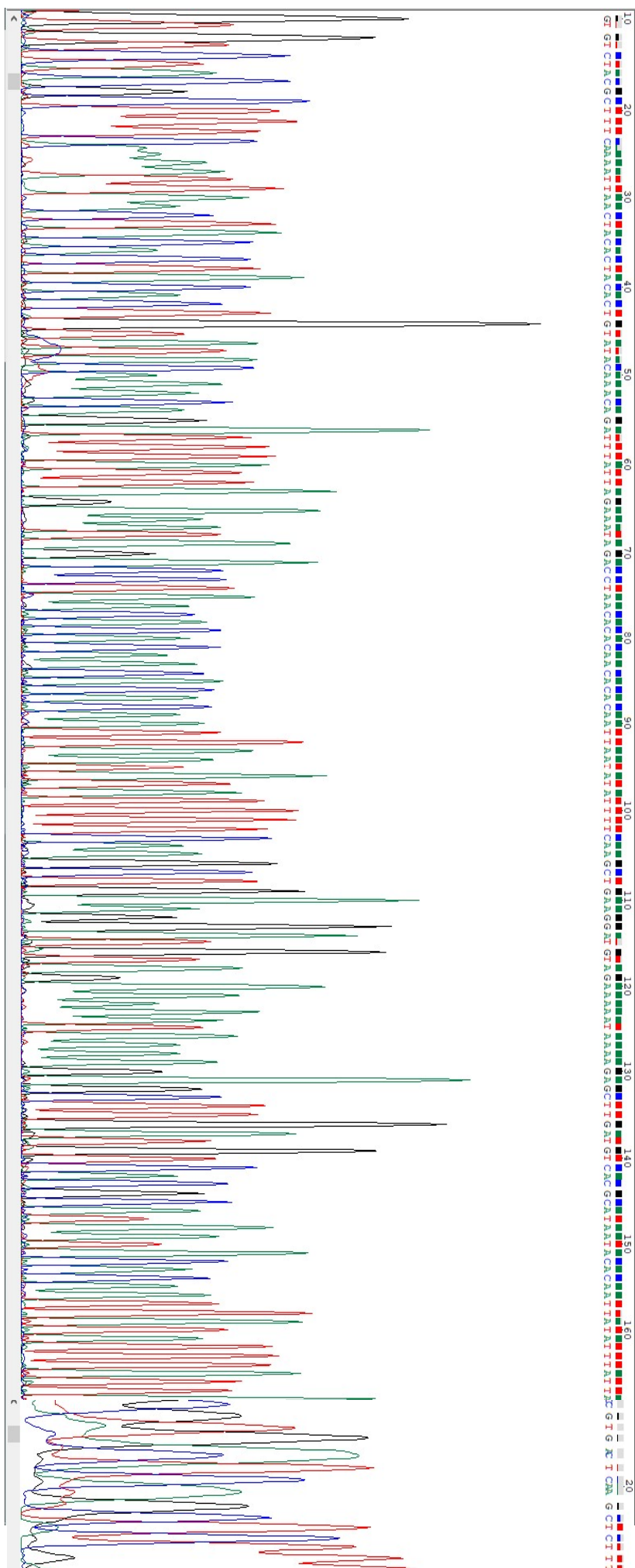
ANEXO 6: Eletroferogramas das amostras positivas sequenciadas:

Amostra 07 InIJ F

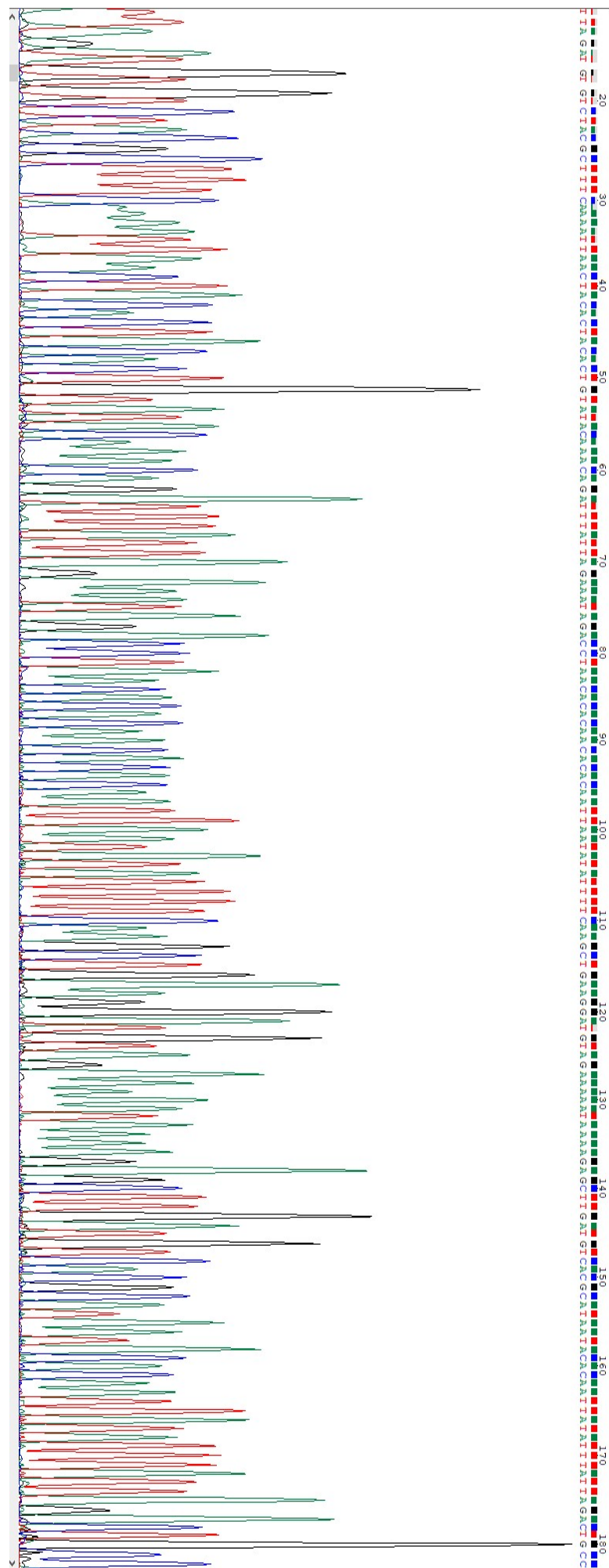
Amostra 7 InIJ R



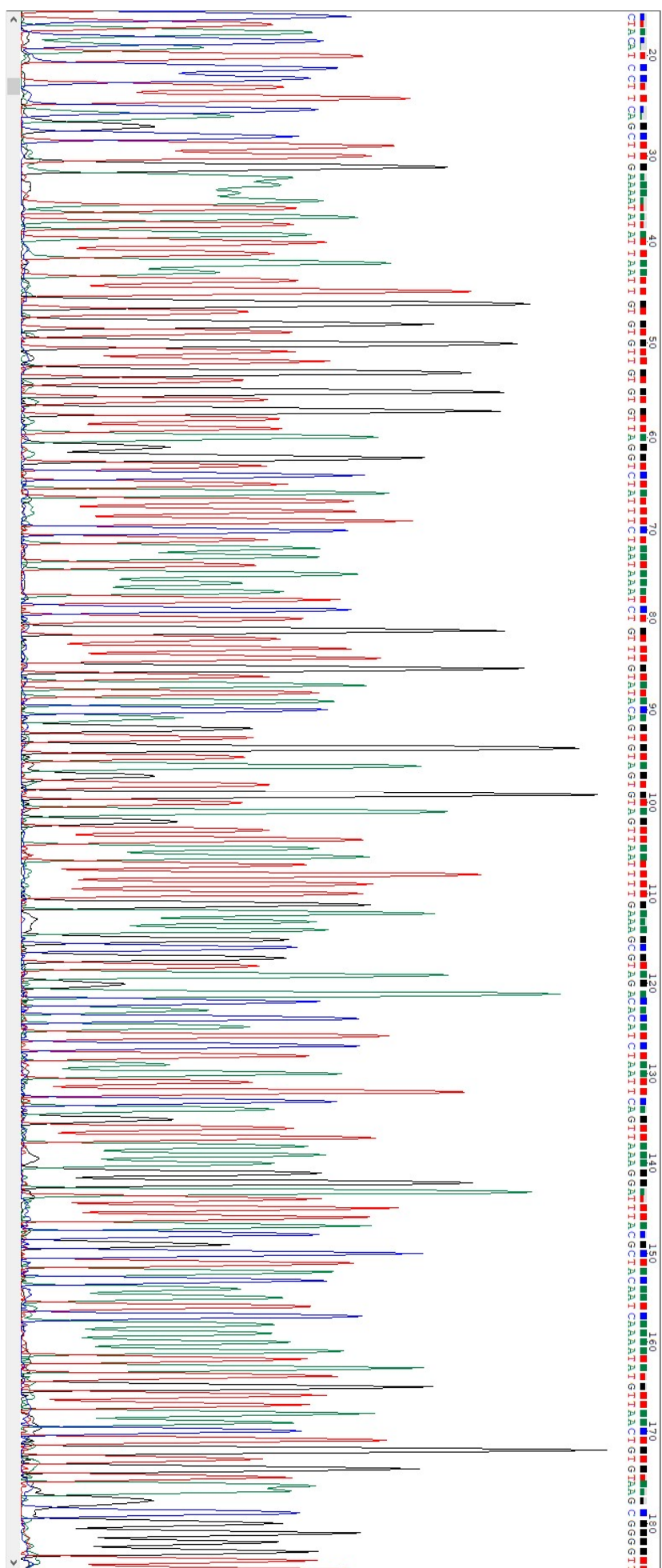
Amostra 22 InIJ F



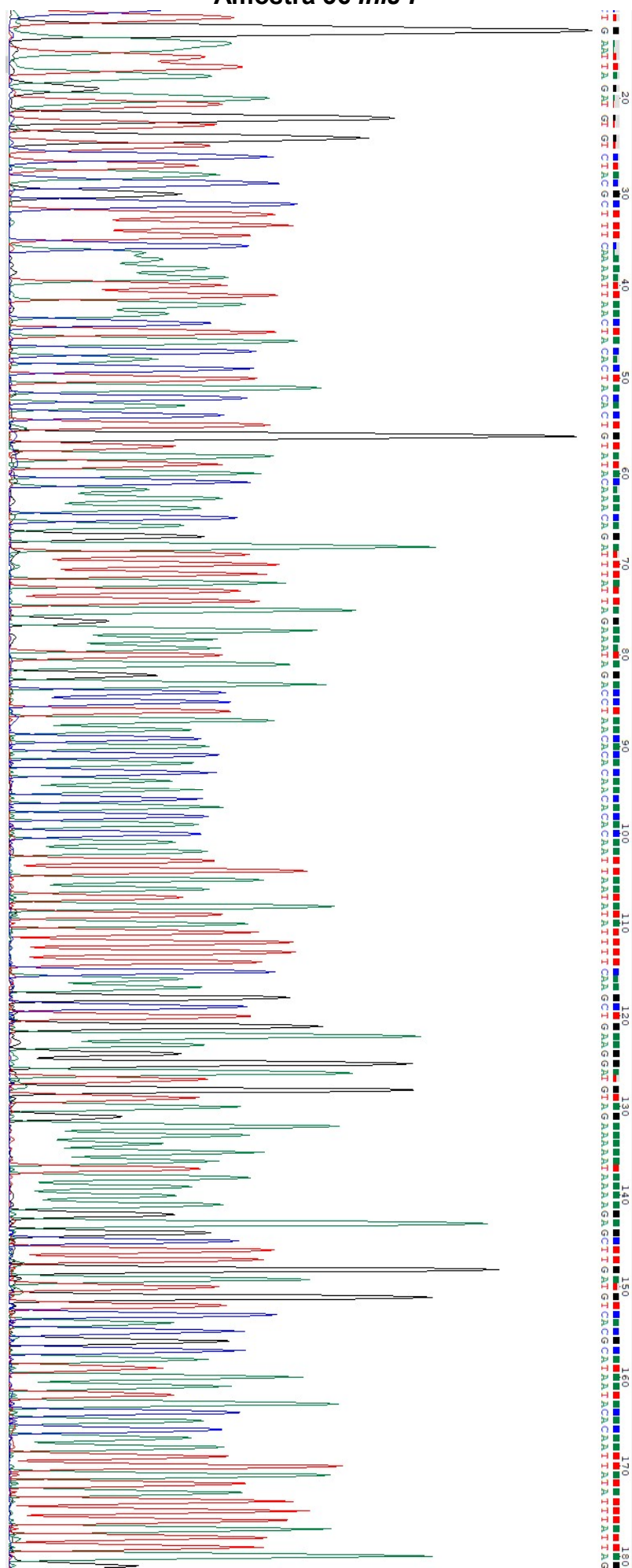
Amostra 26 InIJ F



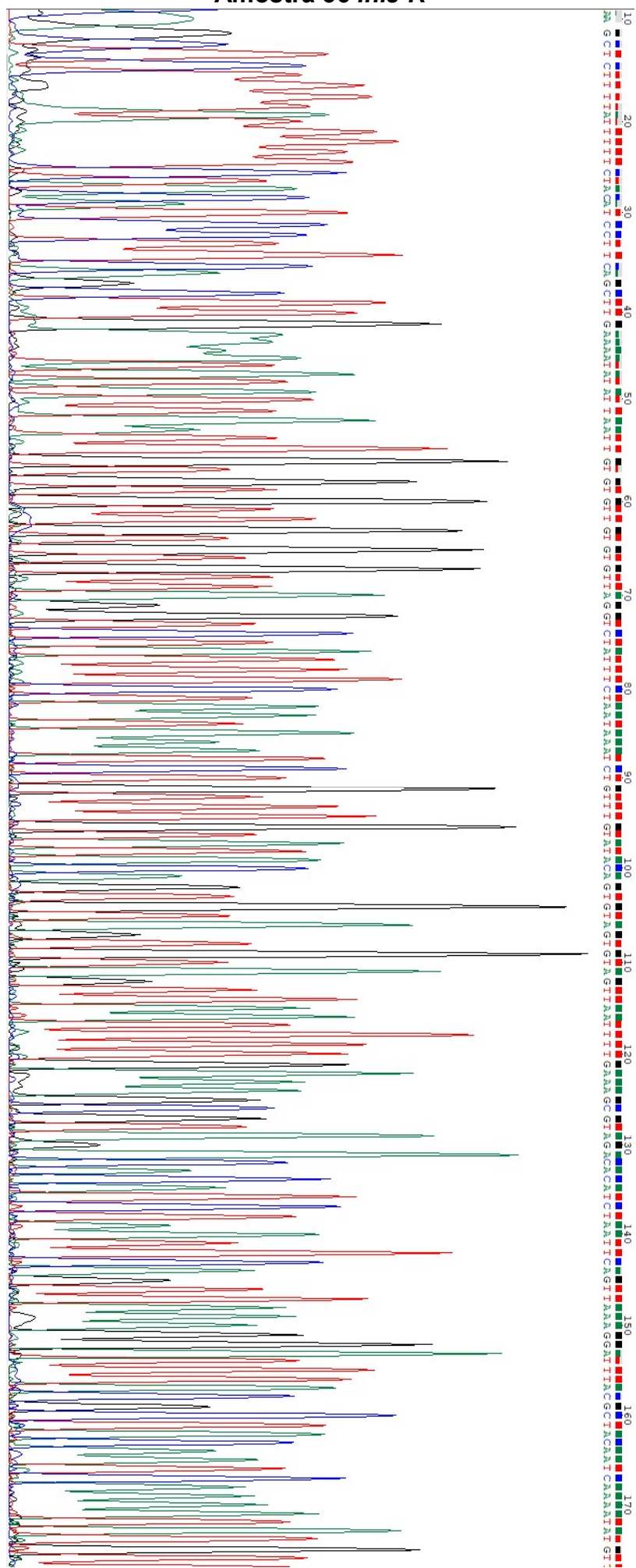
Amostra 26 InIJ R

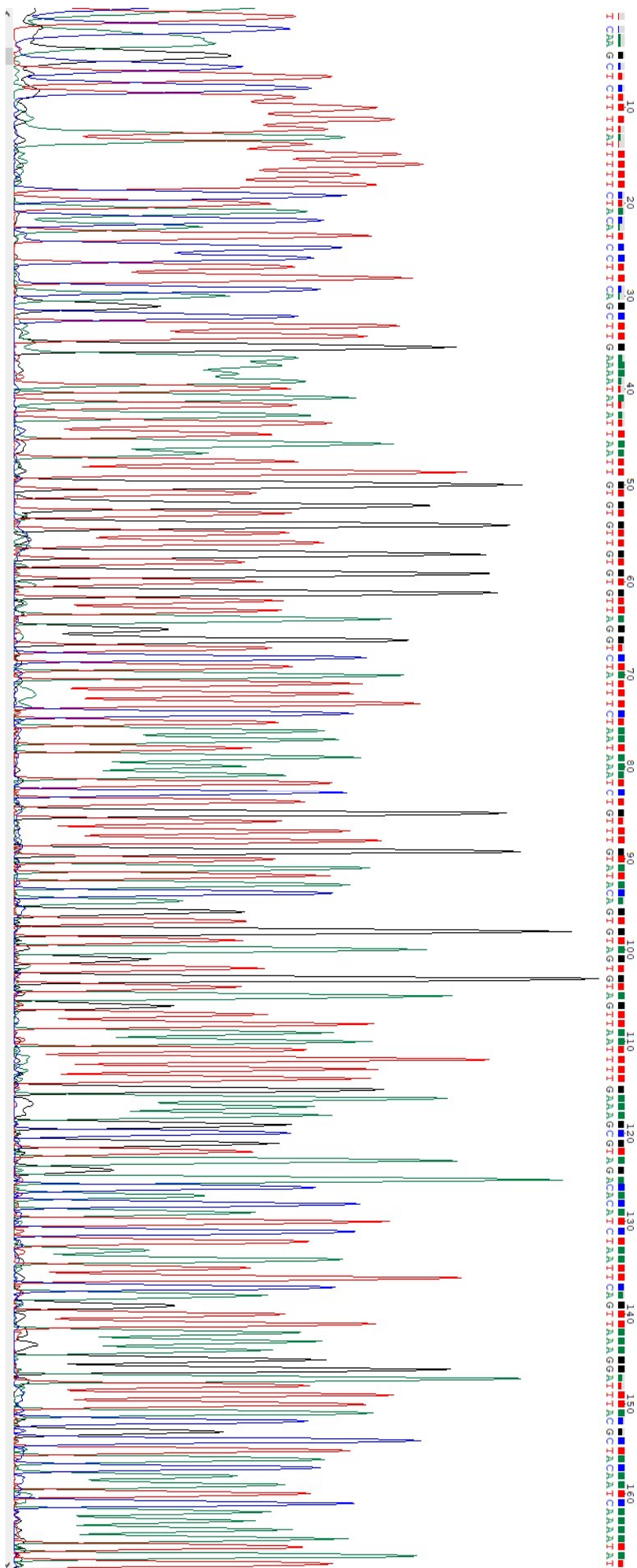


Amostra 36 InIJ F

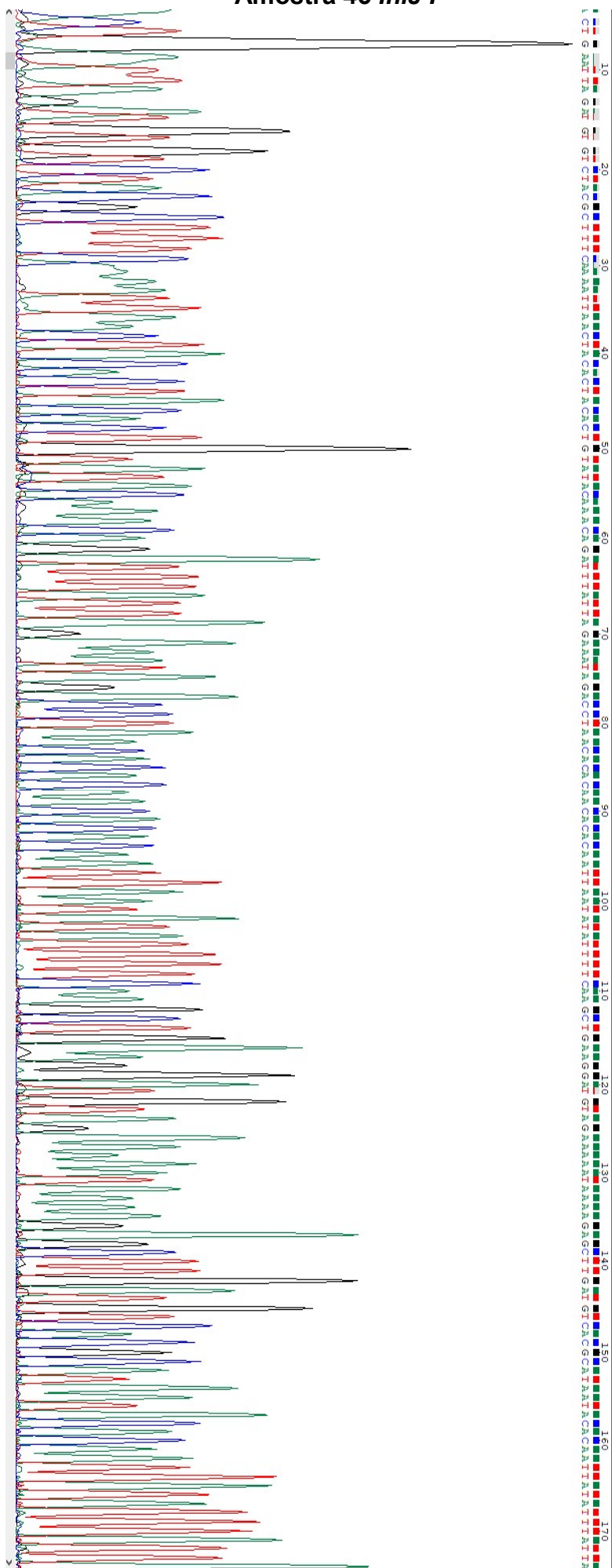


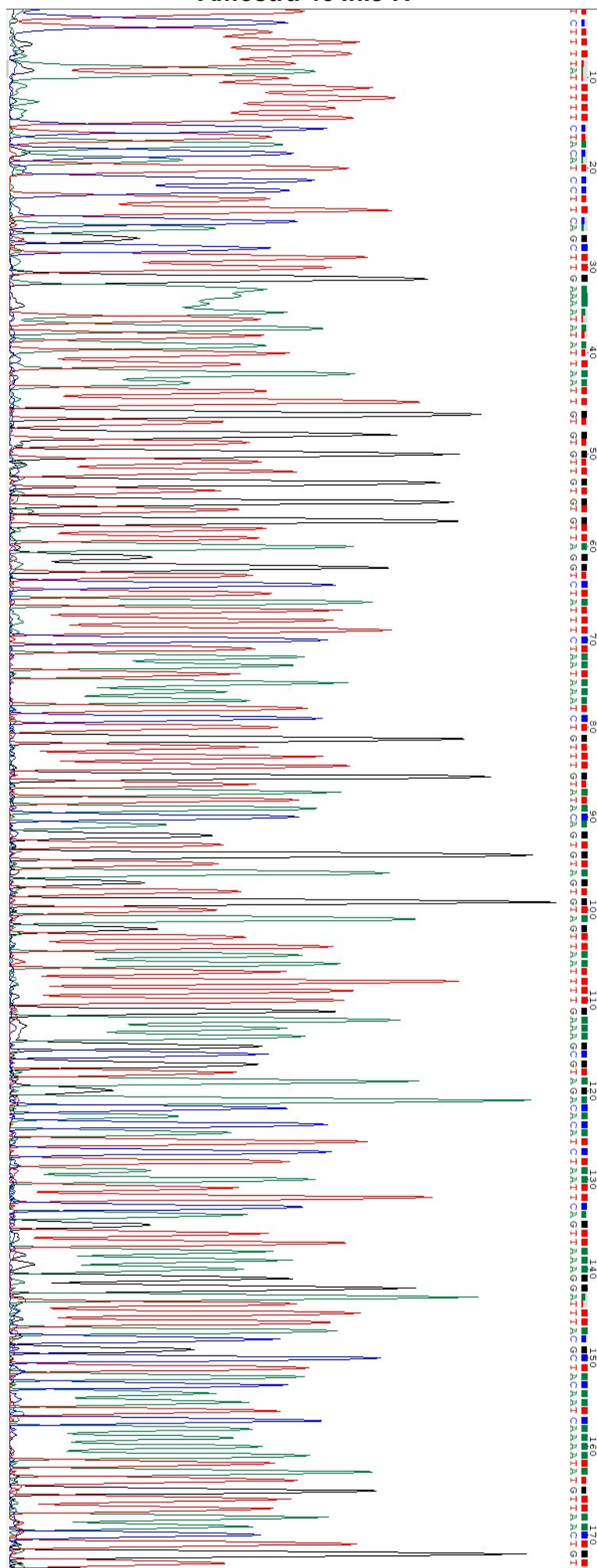
Amostra 36 InIJ R



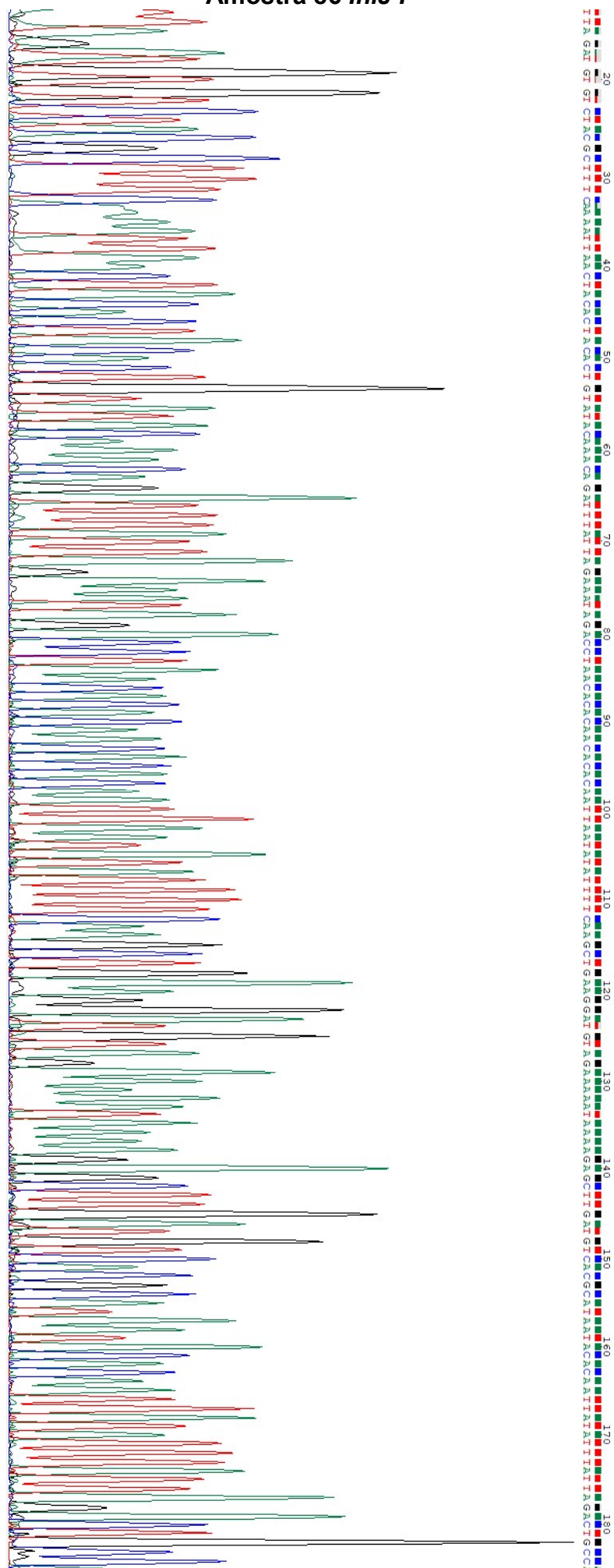
Amostra 44 InIJ R

Amostra 45 InIJ F

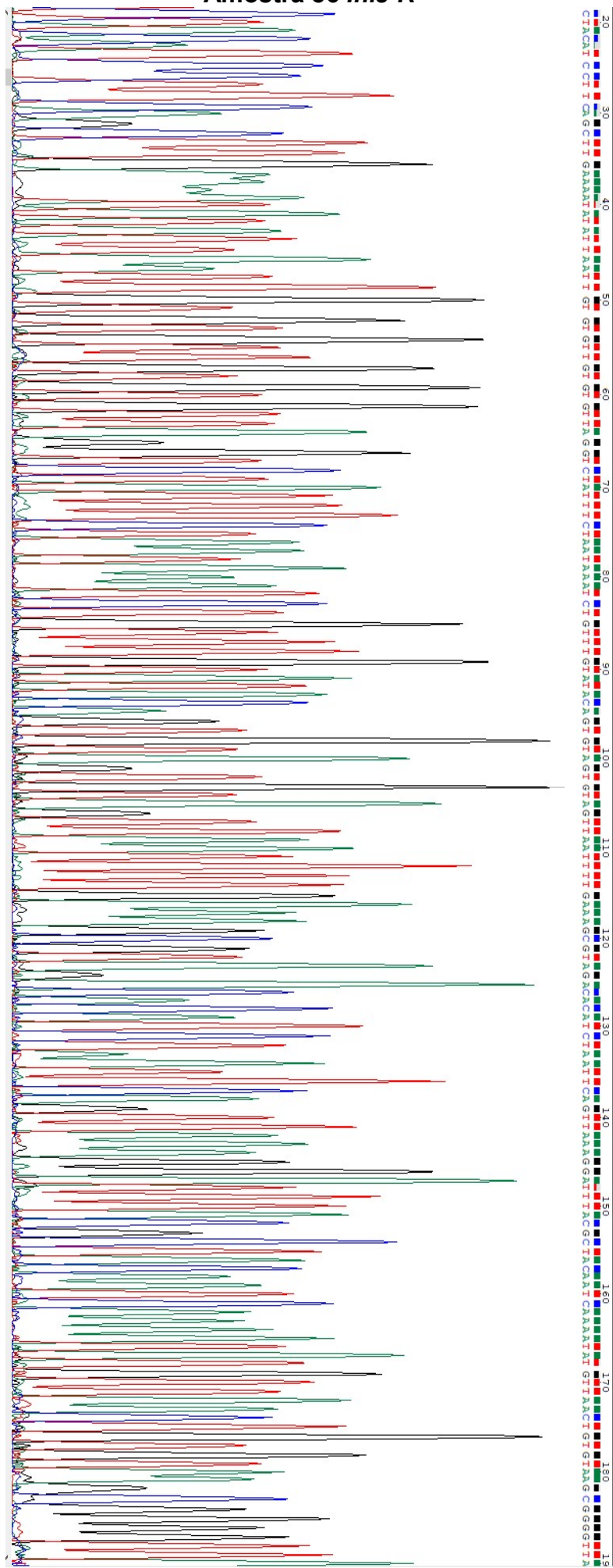


Amostra 45 InIJ R

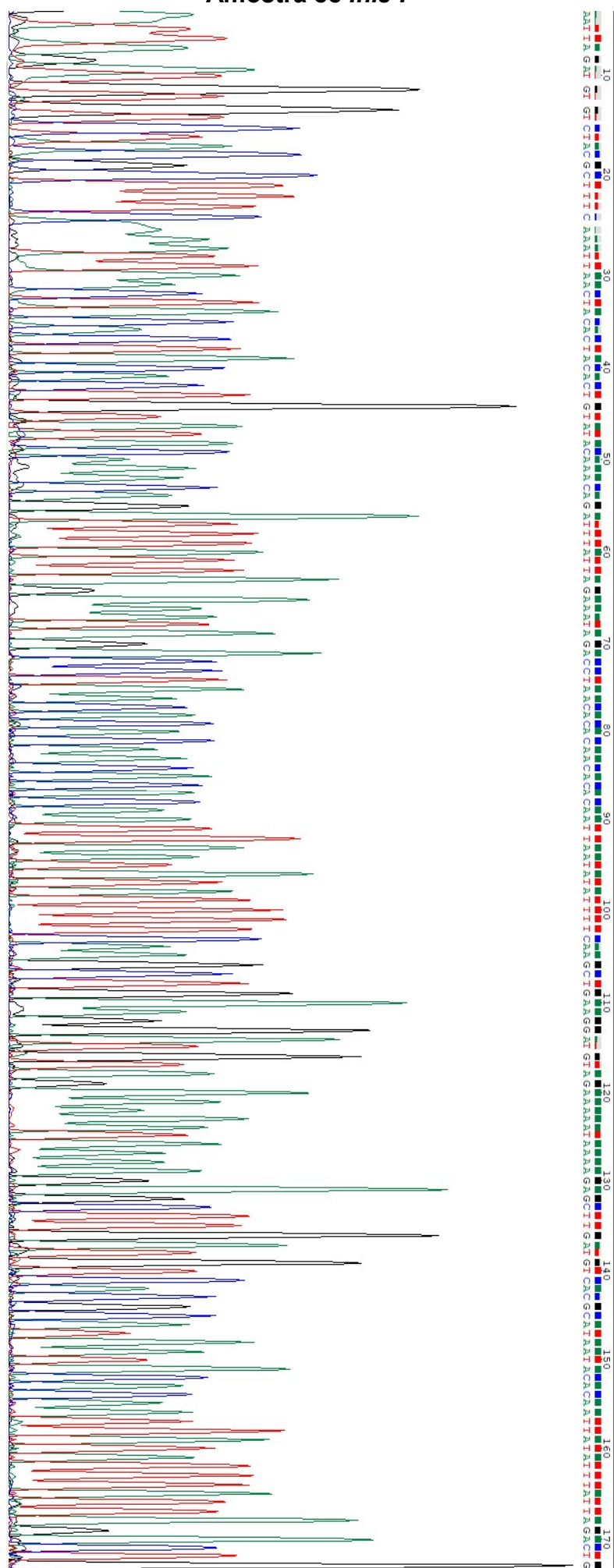
Amostra 86 InIJ F



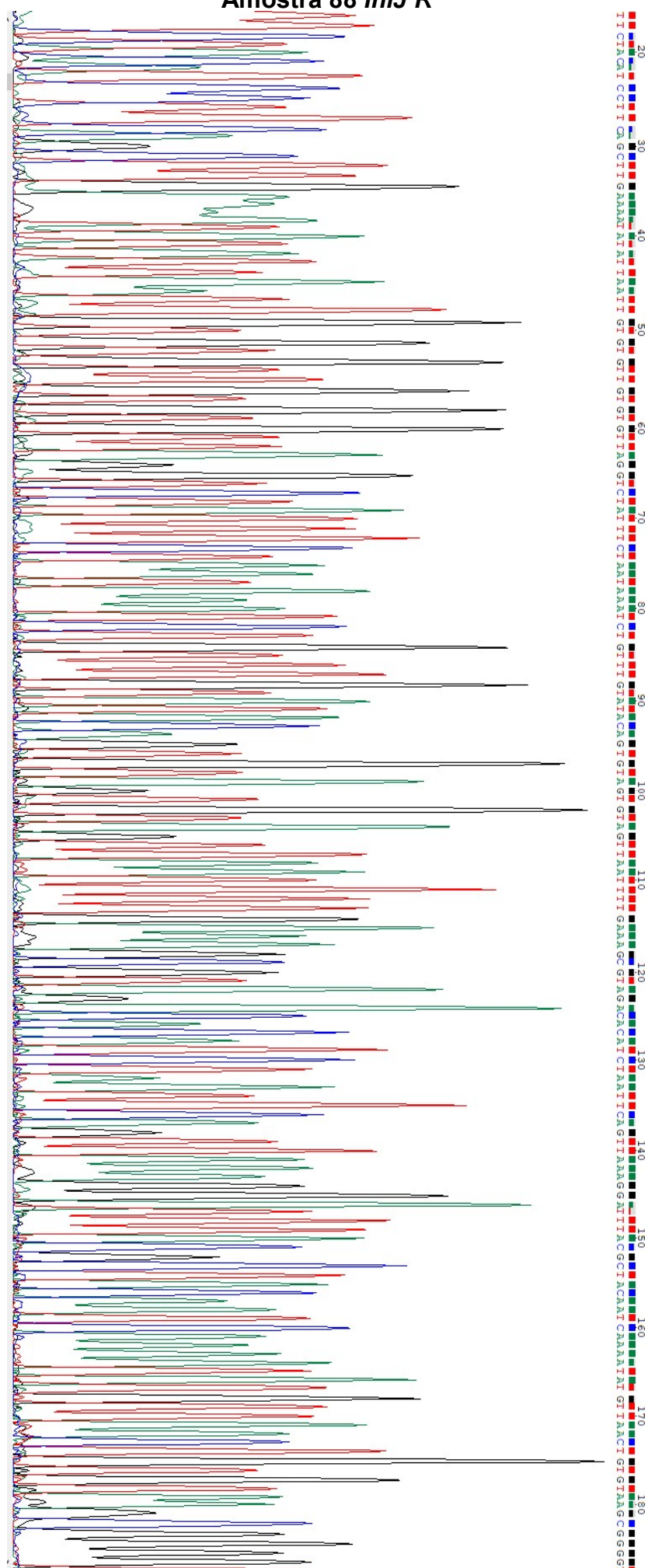
Amostra 86 InIJ R

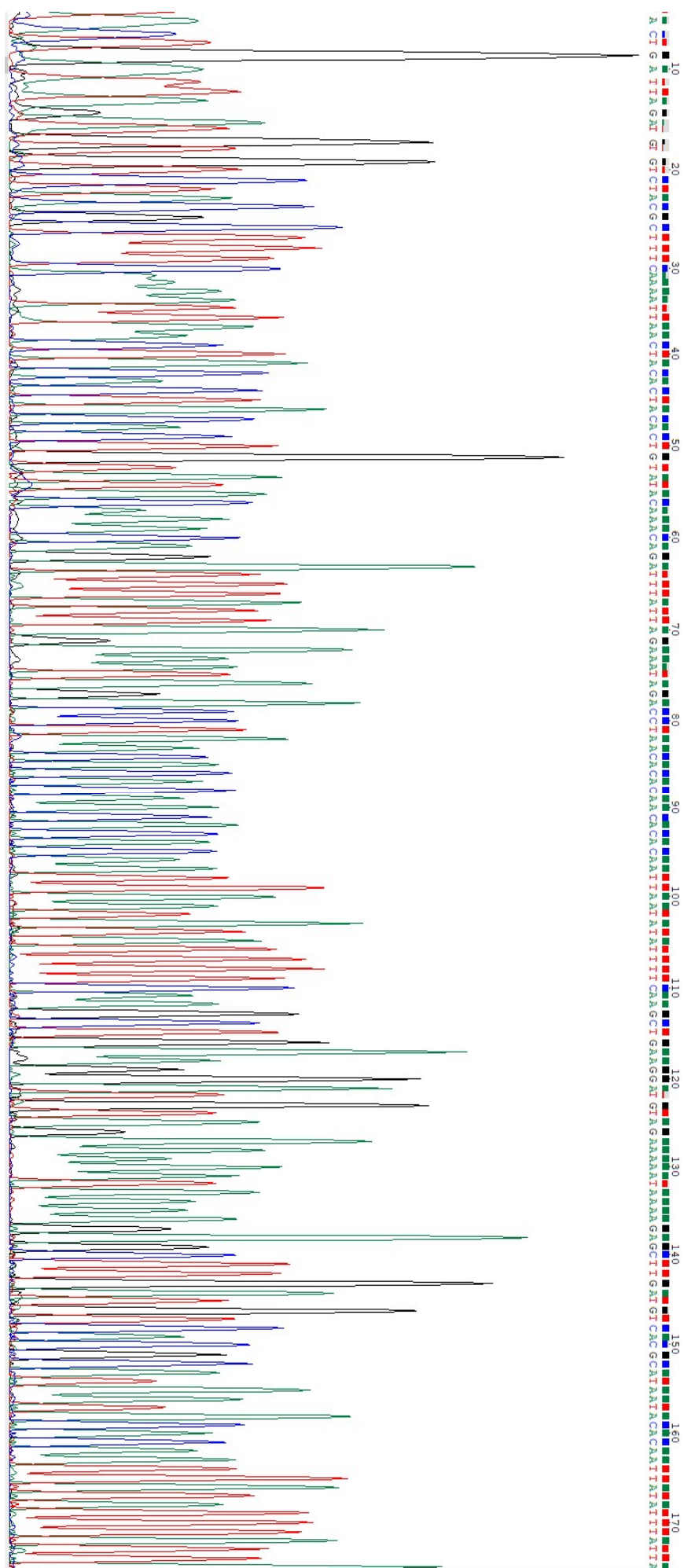


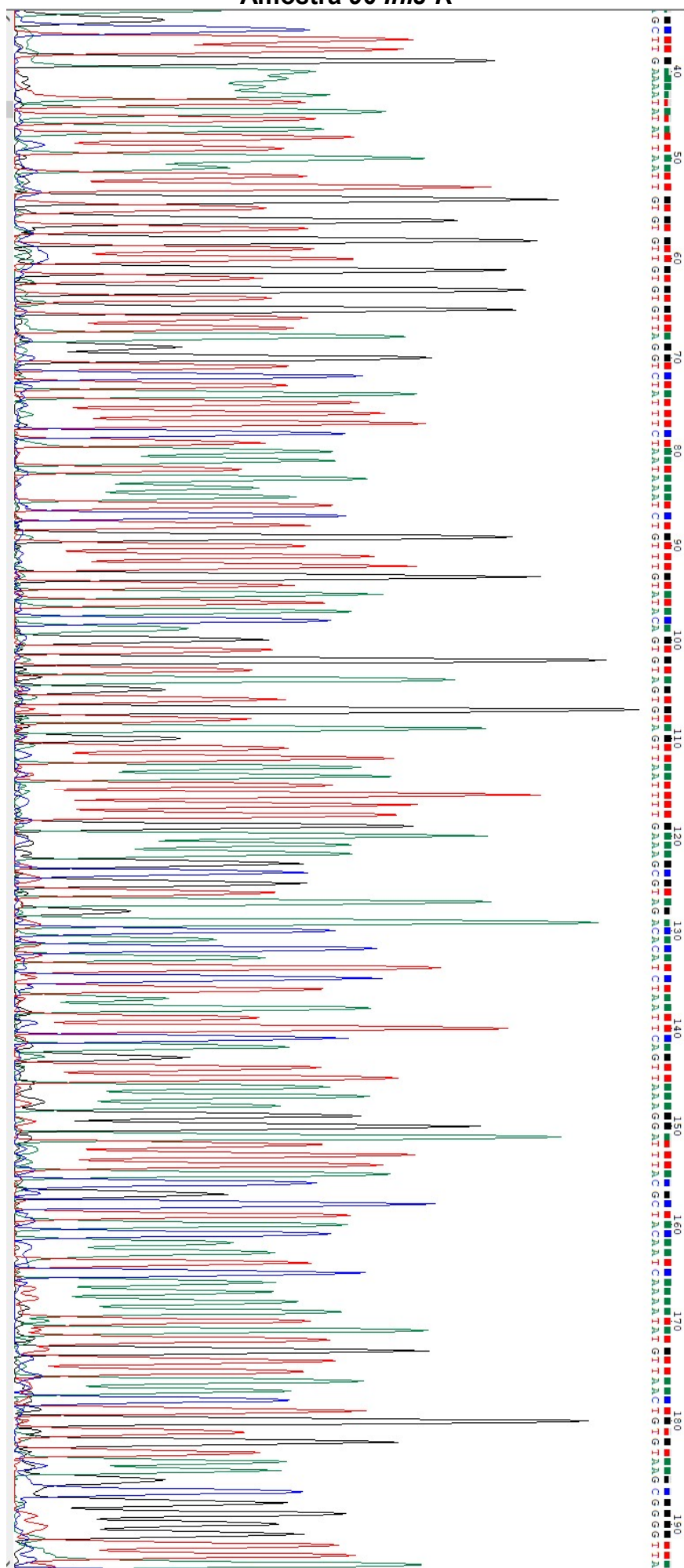
Amostra 88 InIJ F

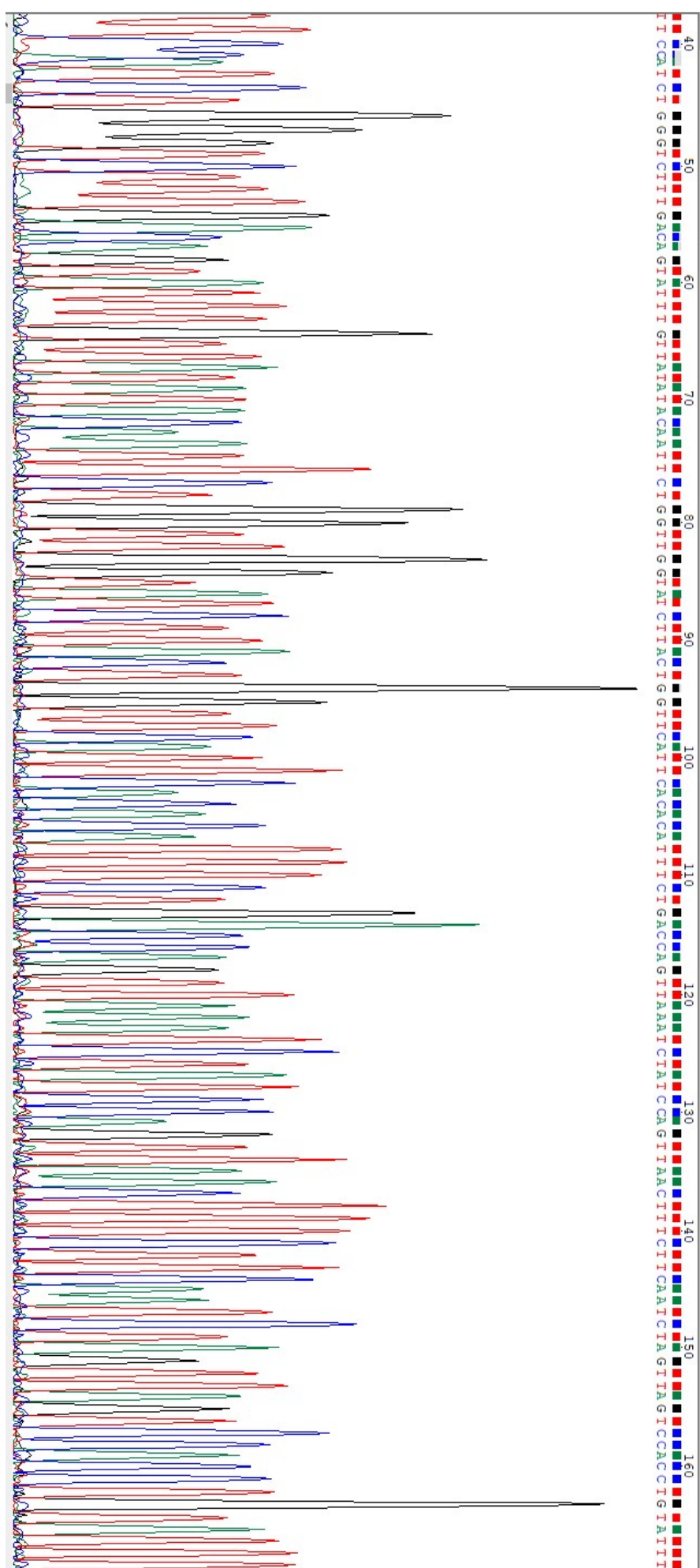


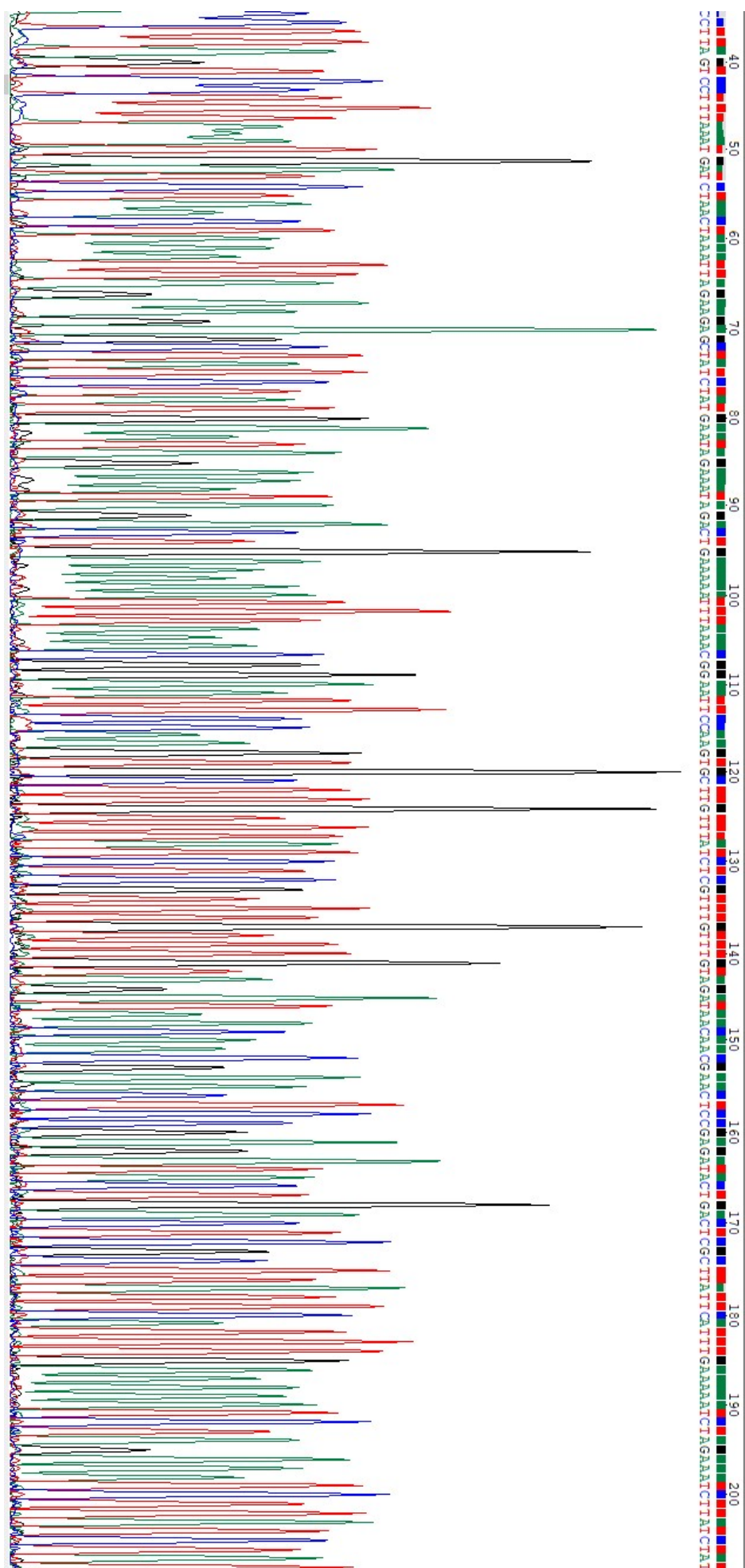
Amostra 88 InIJ R



Amostra 90 InIJ F

Amostra 90 InIJ R

Amostra 91 *InIC F*

Amostra 91 *InIC R*

ANEXO 7 – Método MFHPB-30, segundo Pagotto et al. (2001)



Government of Canada

Gouvernement du Canada

HPB Method

MFHPB-30
January 2001

HEALTH PRODUCTS AND FOOD BRANCH

OTTAWA

ISOLATION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* FROM
ALL FOOD AND ENVIRONMENTAL SAMPLES

Franco Pagotto, Elaine Daley, Jeff Farber, and Don Warburton

Bureau of Microbial Hazards,
Food Directorate,
Health Canada,
Postal locator: 2204A2
Ottawa, ON, K1A 0L2Franco_Pagotto@hc-sc.gc.ca
Elaine_Daley@hc-sc.gc.ca**1. APPLICATION**

The method is applicable to the detection of viable *Listeria monocytogenes* in foods (seafood, dairy products, red meat, poultry, vegetables, etc.) to determine compliance with the requirements of Sections 4 and 7 of the Food and Drugs Act. Environmental samples can also be analysed using this method. This revised method replaces MFHPB-30, dated September 1998.

2. PRINCIPLE

This method determines the presence of viable *L. monocytogenes* in the product. A portion of the product is enriched first in a primary broth, then in a screening broth, plated onto a specified agar medium and one additional plating medium, and then incubated under specified conditions of time and temperature. It is assumed that viable *L. monocytogenes* cells will multiply under these conditions and give rise to visible colonies which can be identified. This method is based on those of Lovett (7.1, 7.2), Hitchins (7.2a) and McClain and Lee (7.4), that have been modified on the basis of data collected in comparative studies by Warburton et al. (7.6, 7.7, 7.8). It was revised by the addition of modified Fraser broth (7.4), lithium chloride-phenylethanol-moxalactam medium (7.3), and Oxford (7.6), modified Oxford (7.4), and/or PALCAM (7.8) agars. Novel chromogenic and other isolation agars may be used in conjunction with the above media.

3. DEFINITION OF TERMS

See Appendix A of Volume 2.

4. COLLECTION OF SAMPLES

4.1 See Appendix B of Volume 2.

4.2 For environmental samples, follow the sampling procedures given in MFLP-41.

5. MATERIALS AND SPECIAL EQUIPMENT

Listeria broths and agars (base media and supplements are commercially available)

- 1) *Listeria* enrichment broth (LEB)
- 2) Modified Fraser broth (MFB)
- 3) Oxford agar (OXA)
- 4) Lithium chloride-phenylethanol-moxalactam medium (LPM)
- 5) Modified Oxford agar (MOX)
- 6) PALCAM agar (PAL)
- 7) Chromogenic media (follow manufacturer's instructions for preparation and use)

NOTE: The *Listeria* isolation agar, Oxford, uses cycloheximide as a selective agent. The organization holding the patent on this antibiotic is no longer producing it, and as a result cycloheximide will be unavailable shortly. Some media suppliers, such as Oxoid, have already produced alternative supplements for their media, which can be substituted in the media. However, it is up to the users of this method to ensure that their in-house validation data meets their criteria. Data may be obtained from the manufacturer and should be kept on file.

- 8) Control cultures (use ATCC strains or equivalent)
Positive controls: *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovi*, *Listeria innocua*,
(*Staphylococcus aureus* and *Rhodococcus equi* - optional)
- 9) Stomacher, blender or equivalent, vortex mixer
- 10) Microscope
- 11) Incubators capable of maintaining 30°C and 35°C

NOTE: It is the responsibility of each laboratory to ensure that the temperature of the incubators or water baths are maintained at the recommended temperatures. Where 35°C is recommended in the text of the method, the incubator may be at 35 ± 1.0°C. Similarly, lower temperatures of 30 or 25°C may be ± 1.0°C. However, where higher temperatures are recommended, such as 43 or 45.5°C, it is imperative that the incubators or water baths be maintained within 0.5°C due to potential lethality of higher temperatures on the microorganism being isolated.

Confirmation Media and Reagents

- 12) Tryptose broth and agar (TA)
- 13) Trypticase soy broth and agar, with 0.6% yeast extract (TSB-YE and TSA-YE)
- 14) Horse blood agar and (sheep blood agar - optional)

- 15) Motility test medium
- 16) Carbohydrate fermentation agars or broths (mannitol, rhamnose and xylose). **Note:** these biochemicals may be done via rapid identification kits (see 6.8.1)

Optional

- 17) Rapid identification kits, such as the Vitek or API *Listeria* (Bio Mérieux Vitek, Inc.), Micro-ID *Listeria* (Oxoid) or the *Listeria* AccuProbe™ Test (GenProbe, MEI D-88) or

sufficient amount of LEB. Maintain a ratio of 1 part sample material to 9 parts LEB. Place environmental swabs in 10 mL portions of LEB in test tubes. Blend, stomach or vortex as required for thorough mixing. LEB culture may be incubated in the stomacher bag or test tube, or transferred to a sterile Erlenmeyer flask. Incubate LEB culture for 48 h at 30°C.

6.5 Selective Enrichment

- 6.5.1 At 24 and 48 h, mix the LEB culture by swirling or vortexing, and inoculate 10 mL of modified Fraser Broth (MFB) with 0.1 mL of the LEB culture. Incubate 24-26 h at 35°C.

HELPFUL HINT: Vortex the MFB at 20 to 24 h, then reincubate for an additional 2 to 6 h before reading reaction. Reading the MFB at 26 h can substantially reduce the plating done at 48 h.

- 6.5.2 Streak MFB onto plates if positive. A positive broth has darkened and may be black, dark brown or dark green. A negative MFB has the straw colour of a newly made broth. If negative, reincubate another 24 h and streak if positive. Proceed with Step 6.6.

6.6 Isolation Procedure

- 6.6.1 Streak positive MFB; those inoculated from LEB at 24 and 48 h onto two different plating media (streaking LEB is optional but preferable for obtaining all *Listeria*). Use Oxford agar (OXA) and one of the following: lithium chloride-phenylethanol-moxalactam medium (LPM), modified Oxford agar (MOX), or PALCAM agar (PAL). Incubate LPM plates at 30°C for 24-48 h and OXA, MOX and PAL plates at 35°C for 24-48 h. Other media may be used along with the two selective agars (see 6.6.5).
- 6.6.2 **LPM** - Examine LPM plates for suspect colonies using beamed white light powerful enough to illuminate the plate well, striking the plate bottom at a 45° angle. Under optimum transillumination the more isolated and larger (48 h old) *Listeria* colonies appear as whitish piles of crushed glass often showing mosaic-like internal structures occasionally having blue-grey iridescence that tends to sparkle. Alternatively, the colonies can look smooth with a blue tinge around the perimeter. When growth becomes near confluent, an even blue-grey iridescent sheen can be observed.
- 6.6.3 **OXA and MOX agars** - *L. monocytogenes* forms 1 mm diameter black colonies surrounded by black haloes after 24 h. At 48 h colonies are 2-3 mm in diameter, black with a black halo and sunken centre. The colonies can also appear brown-black or green-black. Other *Listeria* species show a similar appearance. When examined before 24 h, growth of *Listeria* spp. is sometimes apparent but without the characteristic blackening. Some strains of this genus, other than *L. monocytogenes*, are inhibited on this medium when incubated at 35°C.
- 6.6.4 **PAL agar** - *L. monocytogenes* forms 2 mm grey-green colonies with a black sunken centre and a black halo on a cherry-red background. Some *Enterococcus* and *Staphylococcus* strains form grey colonies with a brown-green halo or yellow colonies with a yellow halo.
- 6.6.5 **Chromogenic agar** - novel chromogenic and other isolation agars may be used, but in conjunction with the plating media above. Follow manufacturer's instructions for preparation and use.

6.7 Identification Procedure - Confirmation

- 6.7.1 If the colonies are well isolated on the selective agars: Pick a minimum of 5 typical colonies from each selective plate to horse blood agar (as in 6.7.2). If the colonies are NOT well isolated on the selective agars: Pick a minimum of 5 typical colonies from each selective plate to Tryptose agar (TA) or Trypticase soy agar with 0.6% yeast extract (TSA-YE), streaking for separation. Incubate plates at 30°C for 24-48 h or until

ARTIGO CIENTIFICO

Molecular detection of *Listeria monocytogenes* in refrigerated raw milk and geospatial distribution in small farms from Brazil

Jackieline Sampaio Steinle¹; Amanda Bezerra Bertolini¹; Thainá Valente Bertozzo² Suzane Manzini²; Isabella Neves Aires²; Maria Eduarda Cavaleiro²; Marcela Alexandrino²; Andresa Xavier Frade Gomes¹; Vera Cláudia Magalhães Curci³; Juliano Gonçalves Pereira¹; Rafael Fagnani⁴; Maria Izabel Merino de Medeiros⁵; Virgínia Bodelão Richini-Pereira⁶; Simone Baldini Lucheis^{1,2,5}

¹Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, São Paulo State University (Unesp), Botucatu, São Paulo, Brazil

² Department of Tropical Diseases and Image Diagnosis, Medical College, São Paulo State University (Unesp), Botucatu, São Paulo, Brazil.

³ Paulista Agency of Agribusiness Technology (APTA/SAA), Araçatuba, São Paulo, Brazil.

⁴ Londrina State University (UEL) – Department of Preventive Veterinary Medicine, Londrina, Paraná, Brazil.

⁵ Paulista Agency of Agribusiness Technology (APTA/SAA), Bauru, São Paulo, Brazil.

⁶ Adolfo Lutz Institute, Regional Laboratories Center II, Bauru, Brazil.

Corresponding author: Simone Baldini Lucheis – simone.b.lucheis@unesp.br

Abstract: Listeriosis is a zoonosis whose etiological agent is the bacterium *Listeria monocytogenes*. In humans it causes serious infections, especially in the elderly, children, immunosuppressed patients, newborns and pregnant women. Clinical manifestations include gestational disorders such as miscarriages, stillbirths and perinatal septicemia, as well as enteric and neurological conditions such as meningitis and encephalitis. In Brazil, the prevalence of listeriosis remains unknown, due to the lack of epidemiological surveillance. It is one of the main causes of death in developed countries, characterized as a worrying foodborne pathogen. Milk and dairy products, since they are foods rich in

nutrients, are considered excellent substrates for the development of spoilage and pathogenic microorganisms, being frequently associated with outbreaks of listeriosis. Using the conventional polymerase chain reaction (PCR) technique, the presence of *L. monocytogenes* was investigated in 102 samples of raw milk from bulk tanks of small farms producing milk in eight municipalities of the state of São Paulo, Brazil. For this, the primers PRS, LM1/LM2, inlA, inlC and inlJ were used. Subsequently, spatial analysis of the areas was performed to assess the distribution of positive samples. The molecular analyses enabled detecting that the bacterial DNA uses the primers PRS, inlJ and inlC. The level of PRS, which amplifies a segment of the *prs* gene (*lmo0509*), common to the *Listeria* genus, indicated the presence of the pathogen's DNA in 21 of the 102 samples (20.58%), while the inlJ primer, which amplifies a segment of the *lmo2821* gene, and the inlC primer (*lmo1786* gene) detected the agent in 22 samples, resulting in prevalence of 21.57%. For primers inlA and LM1/LM2, there was no amplification. There was positivity in all evaluated municipalities except Bauru. Based on the impact of this bacterium on public health, the molecular detection of *L. monocytogenes* is important to identify the risks involved in the marketing and consumption of raw milk and its derivatives, such as cheese and butter, as well as the socioeconomic impact, since these products are a source of supplementary income for small family farmers.

Key words: Listeriosis, bulk tank milk, bovine, molecular, PCR, DNA.

Financial support: Fapesp

1. Introduction

The *Listeria* genus is composed of species of small Gram-positive rod-shaped bacteria with width ranging from 0.4 to 1.5 μm and length from 0.5 to 2 μm . Among these species, only those with hemolytic capability are pathogenic. *Listeria monocytogenes* is a species that is potentially pathogenic to humans and animals, and as such has high importance to public health (OLIVEIRA et al., 2020; MACÍW et al., 2021).

Its relevance to public health is due to the high rates of hospitalizations and deaths caused by infection, along with the related economic losses, including the costs of suspension of the use of food-handling installations and recall of food products from the market when there is evidence of a link between the food and disease (ARCHER et al., 2018).

Listeria monocytogenes can infect various hosts, causing enteric and neurological problems, including diarrhea, septicemia and miscarriage, with high mortality rates (BAGATELLA; TAVARES-GOMES; OEVERMANN, 2021). In humans, immunocompromised patients, pregnant women, young children and the elderly are particularly susceptible to infections, which are potentially lethal, generating insecurity among consumers and challenges to public health throughout the world. The leading example of this was the outbreak of food-borne listeriosis in 2018 in South Africa, considered the world's largest such outbreak, with 1,024 confirmed cases, resulting in 700 hospital admissions and 200 deaths (28.6%) (WHO, 2018).

In 2020, Brazil's estimated milk production amounted to 35.1 billion liters, an increase of 2.8% in comparison with 2017. The production of inspected milk set a new record of 25.53 billion liters in 2020, an increase of 1.5% in relation to the

previous year (EMBRAPA, 2021). Despite this increase in inspection, large portions of milk and dairy products are still sold via informal commerce without sanitary surveillance.

It is estimated that 9.51 billion liters of uninspected milk was sold in Brazil in 2019 (EMBRAPA, 2020), a situation that poses risks to consumers because of the lack of assurance of proper hygienic conditions.

According to data from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE, 2017), 81.2% of the establishments producing cow's milk are small family farms, where dairy activity is an important source of income for farmers and food supply to society. This activity thus has acknowledged socioeconomic importance (BRASIL, 2017).

The hygienic and microbiological quality of raw milk is the result of all the steps of the production chain, from milking and distribution to final consumption. The degree of contamination by microorganisms is a good indicator of the hygienic-sanitary conditions along this chain (REGUILLO et al., 2018).

Raw milk can be contaminated during milking, in bulk tanks, by residual water from milking equipment and utensils, and poorly disinfected teats. In dairy industries, the main routes of infection by these pathogens are contaminated raw milk, utensils and equipment; soil clinging to the clothes and footwear of workers or visitors; ventilation systems; pooled water or dew; and transport vehicles. Some strains of *L. monocytogenes* can colonize and remain in processing areas for months or even years, making it a significant challenge to eradicate these bacteria (RUUSUNEN et al., 2013).

Throughout the world, demand by consumers for raw milk and its unpasteurized derivatives has been rising in recent years, due to questions of health, nutritional and organoleptic characteristics, taste and freshness (HECKMAN, 2019).

On the other hand, the consumption of raw milk and its derivatives processed without heat treatment or with inadequate control measures is associated with outbreaks of human listeriosis, with high risk of death. This situation is aggravated in Brazil by the absence of pathogen monitoring programs. The lack of epidemiological data on the identification and diagnosis of cases and their link to probable sources of infection makes the true occurrence of listeriosis unknown (WHO, 2021). So, considering the increase in mortality from the disease in humans and few diagnostic studies in milk, the present study investigated *L. monocytogenes* in raw bovine milk from the bulk tanks of small dairy farms characteristic of family farming.

2. Material and Methods

2.1. Ethical approval

This study was approved by the Ethics Committee (CEUA) of the Botucatu School of Veterinary Medicine and Animal Science of the São Paulo State University (FMVZ/UNESP), under registration number 18/2021.

2.2. Samples of cow's milk from bulk tanks

Milk samples were obtained from 102 individual bulk tanks, with one sample per farm, located in eight municipalities in the midwest region of the state of São Paulo, Brazil: Avaré (n = 47), Cerqueira Cesar (n = 10), Arandu (n = 4),

Bofete (n = 7), Pardinho (n = 16), Anhembi (n = 13), Botucatu (n = 2) and Bauru (n = 3).

The milk samples were collected directly from individual bulk tanks with maximum temperature of 4 °C, containing milk from cows milked in the previous 48 hours. Before collection, the tank agitator was activated to homogenize the milk for at least 5 minutes, after which a sterilized stainless-steel ladle was used to collect 250 mL of raw milk, which was placed in a sterile plastic jar. The jars were then placed in an isothermal chest containing recyclable ice packs and taken to the laboratory for the analytic procedures.

2.3 Molecular tests

2.3.1 Extraction of DNA from the milk to identify *L. monocytogenes*

The DNA from the milk samples was extracted with the commercial kit Illustra Blood GenomicPrep (GE Healthcare®), according to the protocol indicated by the manufacturer, with slight modifications as suggested by Cunha et al. (2006).

2.3.2 Quantification of DNA

The quantity and concentration of nucleic acid extracted from each sample were determined by spectrophotometry, using a NanoVue Plus™ device (GE Healthcare Biosciences, UK), according to values obtained from the A260/280 ratio, according to Desjardins and Conklin (2010). All the DNA samples were kept frozen at -20 °C until used for the PCR analysis.

2.3.3 Selection of primers

The primers were chosen based on specificity, and were submitted to the

GenBank via the BLAST® and Primer-BLAST® options of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

The following oligonucleotide primers were employed:

- a) PR(f/r), selected with the objective of recognizing the species by studying the gene *prs* (phosphoribosyl pyrophosphate synthetase), common to the genus *Listeria* spp. according to Doumith et al. (2004).
- b) LM1/LM2 (BORDER et al., 1990), selected with the goal of studying the gene *hlyA* (*lmo0202*), which encodes listeriolysin O, one of the main virulence factors related to the adhesion, invasion, escape of primary vacuoles and suppression of the host's immune response (LIU et al., 2017; WU, 2015).
- c) *inlA*, *inlC* and *inlJ*, genes that encode internalins, responsible for the internalization, with the objective of determining the virulence of the strain, according to Liu et al. (2007).

2.3.4 Controls

As positive controls, we used *L. monocytogenes* strain ATCC 7644, provided by the Laboratory of Food Inspection (SOAP) of FMVZ – UNESP – Botucatu, and DNA extracted from *L. monocytogenes* strain ATCC 19117, provided by the Laboratory of Inspection of Products of Animal Origin (UEL) – Londrina - Paraná. Ultrapure sterilized water was used as negative control.

2.3.5 Conventional polymerase chain reaction (cPCR)

For the PCRs of the oligonucleotides *PRS(f/r)* and LM1/LM2, we used an individual 0.2 mL reaction tube for each sample, which received PCR buffer (50 mM of KCl, 20 mM of Tris-HCl), 1.6 mM of MgCl₂, 0.2 mM of dNTPs, 1 µL of Taq-Polymerase (Platinum Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 0.2 µM of each primer

(forward and reverse), 1 µL of sample and 8.3 µL of ultrapure water (MIX-PCR). Each tube thus contained 12 µL (11 µL of MIX-PCR and 1 µL of the product extracted from the DNA of the sample tested).

For the PCRs of the oligonucleotides *inlA*, *inlC* and *inlJ*, we used an individual reaction tube for each sample, which received PCR buffer (50 mM of KCl, 20 mM of Tris-HCl), 0.75 mM of MgCl₂, 0.5 mM of dNTPs, 0.5 µL of Taq-polymerase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 0.5 µM of each primer (forward and reverse), 2 µL of the sample in question and 17.5 µL of ultrapure water (MIX-PCR). Therefore, each tube contained 25 µL (23 µL of MIX-PCR and 2 µL of the product from extraction of the DNA from the sample tested).

The reactions were performed with a Mastercycler Pro Gradient thermocycler (Eppendorf®). For the primers *PRS(f/r)*, *inlC* and *inlJ*, the reactions were based on the protocol described by DOUMITH et al. (2004); for the primer *LM1/LM2*, the protocol was based on Aznar and Alarcón (2003); and for the primer *inlA*, it was based on Liu et al. (2007).

2.3.6 Agarose gel electrophoresis

Identification of the products amplified by PCR was performed using 2% agarose gel electrophoresis. Products from the amplified *L. monocytogenes* strains were used as positive controls, and sterile mili-Q water as negative control. The size of the amplified fragments was verified by visual comparison with molecular weight standards (ladders) and with the *L. monocytogenes* strains used as positive controls.

3. Sequencing

The cPCR product was purified with the enzyme ExoSap (USB), utilizing 4 µL of the enzyme for each 10 µL of cPCR product, by initial incubation for 1 hour at 37 °C followed by 20 minutes at 80 °C, and then quantification by spectrophotometry. The samples selected were the cPCR products that were most strongly amplified.

The amplicon images were visualized using the Chromas 2.3 software in the form of an electropherogram aligned by the MEGA program (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), version 10.0 (KUMAR et al., 2018). They were subsequently submitted to BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) and compared with the sequences deposited in the relevant databases.

4. Microbiological analysis

Samples that were positive for more than one primer were submitted to microbiological analysis through culturing for isolation of *L. monocytogenes* with the purpose of evaluating the phenotypic characteristics of the colonies and viability of the bacteria, according to the MFHBP-30 method, as described by Pagotto et al. (2001). Briefly, 90 mL of *Listeria* enrichment broth (LEB) was added to 10 mL of each sample and incubated at 30 °C for 48 h. After this period, 0.1 mL of cultured LEB was transferred to a flask containing 10 mL of Fraser *Listeria* selective enrichment broth and incubated at 35 °C for 48 h. In this step, it was already possible to confirm the presence or not of the genus, and when there was suspicion of a positive sample (alteration of color of the Fraser medium), it was submitted to seeding in dishes containing Palcam agar and Oxford agar, followed by incubation at 35 °C for 24 to 48 hours.

5. Spatial analysis

The data were submitted to geoprocessing through the Geographic Information System (GIS) with the QGis 3.16.1 software for mapping of the positive samples, to understand the spatial distribution of the positive cases in the study area.

6. Statistical analysis

The data were transformed into descriptive statistics by calculation of the frequencies and percentages of each primer and municipality through the SAS® OnDemand for Academics software.

3. Results

3.1 Molecular tests

There were 21 milk samples positive for the primer PRS, which amplifies a segment of the gene *prs* (*lmo0509*), common to the genus *Listeria* spp., resulting in prevalence of 20.59%; while 23 samples were positive for the primer inIJ, which amplifies a segment of the gene *lmo2821*, resulting in prevalence of 22.55%; and 22 samples were positive for the primer inIC (*lmo1786*), with prevalence of 21.57%.

3.2 Sequencing

The amplicons were submitted to the BLASTn platform (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) and compared to the sequences deposited in the relevant databases. The results were visualized with the Chromas 2.3 software in the form of an electropherogram and aligned by the MEGA program (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), version 10.0 (KUMAR et al., 2018).

With regard to the samples positive to the gene *inIJ*, samples 7, 22, 26, 36, 44, 45, 86, 88 and 90 were 100% similar to *L. monocytogenes* (access key: CP054846.1). For the primer *inIC*, the sample selected was 91, which obtained 100% similarity (access key: CP0054040.1).

3.3 Microbiological analyses

There was no growth of *L. monocytogenes*.

3.4 Spatial analysis

The spatial analysis of the municipalities of the dairy farms evaluated allowed detecting *L. monocytogenes* in tank milk samples, confirming positivity in all the municipalities except Bauru, namely Avaré, Cerqueira Cesar, Arandu, Bofete, Pardinho, Anhembi and Botucatu. Figure 1 depicts the municipalities of the farms with tank milk samples positive for *L. monocytogenes* according to PCR.

Figure 1: Map of the State of São Paulo - Brazil

Figure 2: Number of tank milk samples positive for *L. monocytogenes* and the respective municipalities of origin.

4. Statistical analysis

The statistical analysis showed that 50 milk samples (49%) were positive with at least one primer, i.e., nearly half of the milk samples contained the bacterium. The most frequent primer was *inIJ*, with 23 positive samples (22.55%), followed by the primers *inIC*, with 22 positive samples (21.57%) and the primer *PRS*, with 21 positive samples (20.59%).

Of the municipalities surveyed, the greatest prevalence was found in Anhembi, where 76.92% of the samples were amplified by at least one primer, followed by Avaré with 51% positive samples, Cerqueira Cesar and Botucatu with 50%, Bofete with 42.85%, Pardinho with 37.50% and Arandu with 25%. None of the samples collected in Bauru were positive. Twelve milk samples were amplified by more than one primer, of which six (50%) came from Anhembi, four (33%) were from Avaré, and one each was from Cerqueira Cesar and Pardinho. Two samples were amplified by three primers (PRS, inIC and inIJ), both from Pardinho.

For the statistical analysis of the distribution of positive samples by each municipality, we used Fisher's exact test, and found no significant differences between the positive levels (Table 1).

Table 1-Frequency distribution of samples according to municipality and positivity

For statistical analysis of the distribution of positive samples by primer, we used Fisher's exact test followed by the multiple comparisons test, according to Zar (2010). There were no significant differences of the percentages of inIC, inIJ and PRS, but there were differences between inIA and LM1/LM2 (Table 2)

Table 2 – Frequency distribution of samples according to primer and positivity

5. DISCUSSION

The scientific literature and reports from health agencies contain a large number of studies and statistics about human infection by *L. monocytogenes*. Besides these sources, we used articles and studies about the pathogen's ecology in dairy

farms and milk processing plants. We considered factors that affect the sensitivity of detection of the pathogen by PCR and studies of occurrence in milk and dairy products.

Our bibliographic review revealed that the presence of the pathogen in raw milk has been detected with highly variable prevalence in countries for which data are available. In the United States, studies of raw milk in bulk tanks have reported the presence of *L. monocytogenes* ranging from zero to 19.7% (LEE et al., 2019).

In Brazil, the literature review conducted by Barancelli et al. (2011) reported occurrence from zero to 37% in raw milk and from zero to 41% in cheese samples. More recent studies have not found any positive milk samples (OLIVEIRA et al., 2020) or cheese samples (OXARAN et al., 2017).

Various environmental sources have been reported to be possible reservoirs and origins of contamination by *L. monocytogenes* during milking and storage of milk (CASTRO et al., 2018; WHITMAN et al., 2020; RODRIGUEZ et al., 2021; BAGATELLA; TAVARES-GOMES; OEVERMANN; 2021). Traits such as ability to grow in a wide temperature range, intracellular habit, facultative anaerobia and halotolerance give the pathogen strong resistance and great adaptability to hostile environments, allowing its widespread diffusion, especially in dairy farms (COLAGIORGI et al., 2016; RADOSHEVICH, COSSART, 2018; RODRIGUEZ et al., 2021).

Water and soil are places where the bacterium is commonly isolated, directly exposing livestock through their feeding in pastures. Silage with poor quality is also considered an important source of infection. The infected animals eliminate the pathogen in their feces, potentially contaminating soil, crops and water

sources, perpetuating the cycle (CASTRO et al., 2018; RODRIGUEZ et al., 2021).

The presence of *L. monocytogenes* in the udders of animals before milking has been described as the main risk factor for presence in milk. The bacteria, through cross-contamination, can be present due to poor hygiene before milking or via intramammary infection (CASTRO, 2022).

Contaminated silage has repeatedly been identified as a source of animal infection. When ingested, the pathogen reaches the udder via the bloodstream, with consequent excretion in the milk (BAGATELLA; TAVARES-GOMES; OEVERMANN, 2021).

Contaminated raw milk, when intended for production of dairy products, can be a source of contamination of milking equipment, filters, bulk tanks (WHITMAN et al., 2020; RODRIGUEZ et al., 2021) and plants producing dairy products. This contamination can be aggravated by the ability to form biofilms by strains of *L. monocytogenes*, enabling greater adhesion to surfaces and resistance to sanitizers (CASTRO et al., 2018).

There has been a good deal of discussion regarding standardizing a fast and efficient protocol to detect genes indicative of the virulence factors of *L. monocytogenes* in foods and the environment. However, the wide variety of factors that affect the pathogen's virulence and the sensitivity of PCR make this a challenge, as observed in several studies (DHAMA et al., 2015; CHEN et al., 2017).

It is important to mention that when we followed the PCR cycling protocol described by Liu et al. (2007), for the primers inIC and inIJ there was no

amplification of the positive control, so we employed the cycling described by Doumith et al. (2004) and managed to obtain amplification of the target DNA of the amplicons. It should be considered that various factors can influence the results of molecular analyses, such as the primer choice or quality of the sample. Inhibitors have also been reported negatively in the sensitivity of the PCR technique (AZNAR; ALARCÓN, 2003).

The milk samples indicated as positive in the molecular tests for more than one primer were submitted to microbiological culturing for *L. monocytogenes* with the purpose of evaluating the phenotypic characteristics of the colonies and the viability of the bacterium. However, it was not possible to isolate *Listeria monocytogenes* based on the samples from the molecular tests that were positive to more than one primer. This can be considered a limitation of the study, in light of the microbial competition due to the large quantity of bacteria present in the tank milk, even though we used media specific for isolation of *Listeria*, as well as the sensitivity of bacteria of the genus *Listeria* to competition with the contaminating microflora and natural microflora of raw milk (ALLISON; CHOWDHURY; FOULADKHAH, 2018). Besides this, the bacterial viability might have been influenced by the interaction of factors that affect their survival, such as pH, water activity, osmolarity, number of microorganisms and storage conditions (MOHAMMADI et al., 2011; EKONOMOU et al., 2020). Freezing can also submit cells to stress factors and cause injuries, such as mechanical shear, osmotic alteration, and damages to the cell walls or membranes caused by mechanical stress of the ice crystals formed outside or within the cells, all of which can cause their inactivation (MOHAMMADI et al., 2011; BOZIARIS; PARLAPANI; MIRELES DEWITT, 2021).

Despite the sale of raw milk and its derivatives is restricted in Brazil, it should be stressed that they still can be purchased clandestinely in retail sales, and even on the internet, such as Facebook Marketplace. This type of trade is widespread through the country, mainly in the Southeast, region where this study was conducted (FAGNANI et al., 2022). This situation raises the question about the health risks associated with raw and dairy products. By following this line of reasoning, the high frequency of sales together with the detection of nucleic acid of *L. monocytogenes* must be interpreted as an alert, highlighting the importance of periodic monitoring surveys.

A better understanding of the ecology and pathogenesis of listeriosis and its epidemiology, considering factors of the environment, animals and humans, is needed to support the development of efficient surveillance and control measures to prevent transmission of bacteria and disease to humans, in accordance with the Single Health concept (RODRIGUEZ et al., 2021).

In relation to good manufacturing practices at establishments producing dairy products, the area of receiving the raw milk and other inputs should be effectively separated from the final production area, to prevent cross-contamination resulting from counter flows, associated with a program to monitor both the environment and final products (LEONG et al., 2017; MAĆKIW et al., 2021).

Although refrigeration can control the growth of various pathogenic agents, some can survive and multiply satisfactorily at cold temperatures, as is the case of *L. monocytogenes*, which can act as a contaminant at various steps of obtaining and processing milk. The presence of these bacteria suggests the existence of poor hygiene (REGUILLO et al., 2018; RODRIGUEZ et al., 2021).

Rigorous measures for environmental hygiene, health of herds, implementation

of good dairy manufacturing practices, tracing of bacteria in the environment and animals, and heat treatment of milk are crucial to prevent dissemination of pathogens and control health risks of consuming raw milk and its use to make dairy products (RODRIGUEZ et al., 2021).

To achieve these goals, educational measures and hygiene-sanitary programs need to be implemented among small farmers. The success of such measures can be judged by molecular detection of the pathogen, to evaluate the potential risks to human health and guide the implementation of prevention and control measures for storage and processing of raw milk, to minimize contamination by *L. monocytogenes*.

Analysis of outbreaks of listeriosis in the world has demonstrated the possibility of food-borne dissemination of the disease (WHO, 2018; EFSA, 2021). Although there are no data correlating listeriosis with consumption of contaminated foods in Brazil, the presence of *L. monocytogenes* has often been reported in the country, leading us to believe the disease is underreported (OLIVEIRA et al., 2020). Nevertheless, the relevant national legislation does not include comprehensive programs to monitor this pathogen in animal products, instead only specifying criteria for acceptance of some types of cheese (BRASIL, 2001). Hence, there is a need for monitoring and control measures.

Tools that enable tracking of *L. monocytogenes* strains and determining their origin by testing potentially contaminated samples can serve to guide centralized actions targeted at farms with greater occurrence of the pathogen.

The results from analyzing the primers indicate the importance of bioinformatics as a tool. There is a need for systematic depositing of genetic sequencing data in the NCBI GenBank, to support studies using DNA detection based on updated

data on genomes around the world, since the occurrence of mutations in unstable regions or the existence of organisms not yet recorded can lead to false positive or negative results.

With regard to the spatial analysis, tank milk samples from all the municipalities except Bauru were found to be positive by molecular detection of *L. monocytogenes*. However, this likely was due to the study design, since we only collected three samples from this municipality.

6. CONCLUSION

Our findings indicate it was possible to achieve effective molecular detection of *Listeria monocytogenes* in the tank milk samples evaluated, in detriment to microbiological culture, in which there was no isolation. The PCR technique can be an important tool to identify positive samples, particularly with the genes *prs* and *inlJ* (lmo2821) of *L. monocytogenes*, which was confirmed by the genetic sequencing. We also found that with the cycling protocol described by Doumith et al. (2004) it was possible to amplify the target DNA of the amplicons. Finally, the spatial analysis revealed the possibility of molecular detection of contamination by *L. monocytogenes* in tank milk samples from small farms. The molecular detection of this pathogen thus indicates a need to implement educational measures to support efforts to minimize contamination by *L. monocytogenes* from the storage and processing of raw milk.

Declaration of competing interests

The authors declare they have no known competing financial interests or

personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors thank the São Paulo State Research Foundation (FAPESP) – Grant number 2020/09409-2 for financial support for this study.

REFERENCES

1. ALLISON, A.; CHOWDHURY, S.; FOULADKHAH, A. Synergism of Mild Heat and High-Pressure Pasteurization Against *Listeria monocytogenes* and Natural Microflora in Phosphate-Buffered Saline and Raw Milk. **Microorganisms**, v. 6, n. 4, 2018. DOI [10.3390/microorganisms6040102](https://doi.org/10.3390/microorganisms6040102)
2. ARCHER, D. L. The evolution of FDA's policy on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in the United States. **Current Opinion in Food Science**, v. 20, p. 64–68, abr. 2018. DOI [10.1016/j.cofs.2018.03.007](https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.03.007)
3. AZNAR, R.; ALARCÓN, B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 958–966, 2003. DOI [10.1046/j.1365-2672.2003.02066.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02066.x).
4. BAGATELLA, S.; TAVARES-GOMES, L.; OEVERMANN, A. *Listeria monocytogenes* at the interface between ruminants and humans: A comparative

pathology and pathogenesis review. **Veterinary Pathology**, p. 03009858211052659, 2 dez. 2021. DOI [10.1177/03009858211052659](https://doi.org/10.1177/03009858211052659).

5. BARANCELLI, G. V.; SILVA-CRUZ, J. V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C. A. F. *Listeria Monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 155–168, mar. 2011. DOI [10.1590/1808-1657v78p1552011](https://doi.org/10.1590/1808-1657v78p1552011).

6. BORDER, P. M.; HOWARD, J. J.; PLASTOW, G. S.; SIGGENS, K. W. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 158–162, set. 1990. DOI [10.1111/j.1472-765X.1990.tb00149.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1990.tb00149.x).

7. BOZIARIS, I. S.; PARLAPANI, F. F.; MIRELES DEWITT, C. A. High Pressure Processing at Ultra-Low Temperatures: Inactivation of Foodborne Bacterial Pathogens and Quality Changes in Frozen Fish Fillets. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 74, p. 102811, dez. 2021. <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856421002125>>

8. BRASIL. Decreto nº 9.064, de 31 de maio de 2017. Dispõe sobre a Unidade Familiar de Produção Agrária, institui o Cadastro Nacional da Agricultura Familiar e regulamenta a Lei nº 11.326, de 24 de julho de 2006, que estabelece as diretrizes para a formulação da Política Nacional da Agricultura Familiar e empreendimentos familiares rurais. **Base Legislação da Presidência da República**. Brasília, DF, 2017. Disponível em:

<https://legislacao.presidencia.gov.br/atos/?tipo=DEC&numero=9064&ano=2017&ato=d88oXRE1UeZpWTd3c>

9. CASTRO, H. Epidemiology and growth potential of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia pseudotuberculosis* in raw milk production. 4 mar. 2022. <https://helda.helsinki.fi/handle/10138/339807>.

10. CASTRO, H.; JAAKKONEN, A.; HAKKINEN, M.; KORKEALA, H.; LINDSTRÖM, M. Occurrence, Persistence, and Contamination Routes of *Listeria monocytogenes* Genotypes on Three Finnish Dairy Cattle Farms: a Longitudinal Study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 4, p. e02000-17, 15 fev. 2018. DOI [10.1128/AEM.02000-17](https://doi.org/10.1128/AEM.02000-17)

11. CARLIN, C. R.; LIAO, J.; WELLER, D.; GUO, X.; ORSI, R.; WIEDMANN, M. 2021. *Listeria cossartiae* sp. nov., *Listeria immobilis* sp. nov., *Listeria portnoyi* sp. nov. and *Listeria rustica* sp. nov., isolated from agricultural water and natural environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 004795, 17 maio 2021. DOI [10.1099/ijsem.0.004795](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004795)

12. CHEN, J.-Q.; HEALEY, S.; REGAN, P.; LAKSANALAMAI, P.; HU, Z. PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources. **Food Science and Human Wellness**, v. 6, n. 2, p. 39–59, jun. 2017. DOI [10.1016/j.fshw.2017.03.001](https://doi.org/10.1016/j.fshw.2017.03.001)

13. COLAGIORGI, A.; DI CICCIO, P.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; IANIERI, A. A Look inside the *Listeria monocytogenes* Biofilms Extracellular Matrix. **Microorganisms**, v. 4, n. 3, p. 22, 5 jul. 2016. DOI [10.3390/microorganisms4030022](https://doi.org/10.3390/microorganisms4030022)

14. DESJARDINS, P.; CONKLIN, D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 45, p. 2565, 22 nov. 2010. <https://doi.org/10.3791/2565>.

15. DHAMA, K.; KARTHIK, K.; TIWARI, R.; SHABBIR, M. Z.; BARBUDDHE, S.; MALIK, S. V. S.; SINGH, R. K. Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, v. 35, n. 4, p. 211–235, 2 out. 2015. DOI [10.1080/01652176.2015.1063023](https://doi.org/10.1080/01652176.2015.1063023)

16. DOUMITH, M.; BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; JACQUET, C.; MARTIN, P. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3819–3822, ago. 2004. DOI [10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004](https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004).

17. EKONOMOU, S. I.; BULUT, S.; KARATZAS, K. A. G.; BOZIARIS, I. S. Inactivation of *Listeria Monocytogenes* in Raw and Hot Smoked Trout Fillets by High Hydrostatic Pressure Processing Combined with Liquid Smoke and Freezing. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 64, p. 102427, ago. 2020. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856420303738>.

18. EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). ANUÁRIO LEITE 2021: saúde única e total. – Portal Embrapa. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/224371/1/Anuario-Leite-2021.pdf>.
19. EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) ANUÁRIO LEITE 2020: leite de vacas felizes. - Portal Embrapa. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1124722/anuario-leite-2020-leite-de-vacas-felizes>.
20. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY; EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, v. 19, n. 2, fev. 2021. DOI [10.2903/j.efsa.2021.6406](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406)
21. FAGNANI, R.; BUENO, B. S.; ITIDA, R. M.; GALHARDO, J. A.; VANOT, R. L. A novel approach in public health surveillance: searching the illegal dairy trade in Facebook. *International Journal of Environmental Health Research*, p. 1-11, 2022. DOI: [10.1080/09603123.2022.2039594](https://doi.org/10.1080/09603123.2022.2039594)
22. FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 476–511, set. 1991. DOI [10.1128/mr.55.3.476-511.1991](https://doi.org/10.1128/mr.55.3.476-511.1991).

23. IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE, 2017. Tabela 6912: Número de estabelecimentos agropecuários que produziram leite de vaca, Vacas ordenhadas nos estabelecimentos agropecuários, Quantidade produzida de leite de vaca, Valor da produção de leite de vaca, Número de estabelecimentos agropecuários que venderam leite de vaca cru, Quantidade vendida de leite de vaca cru e Valor da venda de leite de vaca cru, por tipologia, condição do produtor em relação às terras e grupos de cabeças de bovinos. EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). ANUÁRIO LEITE 2020: LEITE DE VACAS FELIZES. São Paulo, Brasil, p. 102, 2020. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6912#resultado>
24. KONOSONOKA, I. H.; JEMELJANOV, A.; OSMANE, B.; IKAUNIECE, D.; GULBE, G. Incidence of *Listeria* spp. in Dairy Cows Feed and Raw Milk in Latvia. **ISRN Veterinary Science**, v. 2012, p. e435187, 26 jan. 2012. DOI [10.5402/2012/435187](https://doi.org/10.5402/2012/435187)
25. KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v.35, n.6, p.1547–1549, 1 jun. 2018. DOI [10.1093/molbev/msy096](https://doi.org/10.1093/molbev/msy096)
26. LEE, S. H. I.; CAPPATO, L. P.; GUIMARÃES, J. T.; BALTHAZAR, C. F.; ROCHA, R. S.; FRANCO, L. T.; DA CRUZ, A. G.; CORASSIN, C. H.; DE OLIVEIRA, C. A. F. *Listeria monocytogenes* in Milk: Occurrence and Recent

Advances in Methods for Inactivation. **Beverages**, v.5, n.1, p.14, mar.2019. DOI [10.3390/beverages5010014](https://doi.org/10.3390/beverages5010014).

27. LEONG, D.; NICAOGÁIN, K.; LUQUE-SASTRE, L.; MCMANAMON, O.; HUNT, K.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; SCOLLARD, J.; SCHMALENBERGER, A.; FANNING, S.; O'BYRNE, C.; JORDAN, K. A 3-year multi-food study of the presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in 54 small food businesses in Ireland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 249, p. 18–26, maio 2017. DOI [10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.015](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.015).

28. LIU, B.; TENG, Z.; WANG, J.; LU, G.; DENG, X.; LI, L. Inhibition of listeriolysin O oligomerization by lutein prevents *Listeria monocytogenes* infection. **Fitoterapia**, v. 116, p. 45–50, jan. 2017. DOI [10.1016/j.fitote.2016.11.012](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.11.012).

29. LIU, D.; LAWRENCE, M. L.; AUSTIN, F. W.; AINSWORTH, A. J. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n. 2, p. 133–140, 1 nov. 2007. DOI [10.1016/j.mimet.2007.08.007](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.08.007).

30. MAĆKIW, E.; KORSAK, D.; KOWALSKA, J.; FELIX, B.; STASIAK, M.; KUCHARZEK, K.; ANTOSZEWSKA, A.; POSTUPOLSKI, J. Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat food products in retail in Poland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 358, p. 109397, nov. 2021. DOI [10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109397](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109397).

31. MATLE, I.; MBATHA, K. R.; MADOROBA, E. A Review of *Listeria Monocytogenes* from Meat and Meat Products: Epidemiology, Virulence Factors, Antimicrobial Resistance and Diagnosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.87, n.1, 9out. 2020.
<http://www.ojvr.org/index.php/OJVR/article/view/1869>.

32. MAURY, M. M.; BRACQ-DIEYE, H.; HUANG, L.; VALES, G.; LAVINA, M.; THOUVENOT, P.; DISSON, O.; LECLERCQ, A.; BRISSE, S.; LECUIT, M. Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 2488, 6 jun. 2019. DOI [10.1038/s41467-019-10380-0](https://doi.org/10.1038/s41467-019-10380-0).

33. MAZAHARI, T.; CERVANTES-HUAMÁN, B. R. H.; BERMÚDEZ-CAPDEVILA, M.; RIPOLLES-AVILA, C.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. *Listeria Monocytogenes* Biofilms in the Food Industry: Is the Current Hygiene Program Sufficient to Combat the Persistence of the Pathogen? **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 181, 15 jan. 2021. <<https://www.mdpi.com/2076-2607/9/1/181>>.

34. MCCOLLUM, J. T.; CRONQUIST, A. B.; SILK, B. J.; JACKSON, K. A.; O'CONNOR, K. A.; COSGROVE, S.; GOSSACK, J. P.; PARACHINI, S. S.; JAIN, N. S.; ETTESTAD, P.; IBRAHEEM, M.; CANTU, V.; JOSHI, M.; DUVERNOY, T.; FOGG, N. W.; GORNY, J. R.; MOGEN, K. M.; SPIRES, C.; TEITELL, P.; ... MAHON, B. E. Multistate Outbreak of Listeriosis Associated with Cantaloupe.

New England Journal of Medicine, v. 369, n. 10, p. 944–953, 5 set. 2013. DOI [10.1056/NEJMoa1215837](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215837).

35. MURRAY, E. G. D.; WEBB, R. A.; SWANN, M. B. R. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 29, n. 4, p. 407–439, 1926. DOI [10.1002/path.1700290409](https://doi.org/10.1002/path.1700290409).

36. NICAOGÁIN, K.; O'BYRNE, C. P. The Role of Stress and Stress Adaptations in Determining the Fate of the Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes* in the Food Chain. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 23 nov. 2016. DOI [10.3389/fmicb.2016.01865](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01865)

37. OLIGO ANALYZER. 2022. Disponível em: <https://www.idtdna.com/calc/analzyer>. Acesso em: 11 mar. 2022.

38. OLIVEIRA, G. C.; JUNQUEIRA, N. B.; GUIMARÃES, F. de F.; SALINA, A.; DALANEZI, F. M.; MANTOVAN, K. B.; JOAQUIM, S. F.; MENOZZI, B.; H. *Listeria monocytogenes* in cow's milk produced by family-owned dairy farms. **Veterinária e Zootecnia**, v. 27, p. 1–10, 6 dez. 2020. DOI [10.35172/rvz.2020.v27.674](https://doi.org/10.35172/rvz.2020.v27.674).

39. OLIVER, S. P.; BOOR, K. J.; MURPHY, S. C.; MURINDA, S. E. Food Safety Hazards Associated with Consumption of Raw Milk. **Foodborne**

Pathogens and Disease, v. 6, n. 7, p. 793–806, set. 2009. DOI [10.1089/fpd.2009.0302](https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0302).

40. O'CALLAGHAN, T. F.; SUGRUE, I.; HILL, C.; ROSS, R. P.; STANTON, C. Chapter 7 - Nutritional Aspects of Raw Milk: A Beneficial or Hazardous Food Choice. In: NERO, L. A.; DE CARVALHO, A. F. (orgs.). **Raw Milk**. [S. l.]: Academic Press, 2019. p. 127–148. DOI [10.1016/B978-0-12-810530-6.00007-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810530-6.00007-9).

41. OXARAN, V.; LEE, S. H. I.; CHAUL, L. T.; CORASSIN, C. H.; BARANCELLI, G. V.; ALVES, V. F.; DE OLIVEIRA, C. A. F.; GRAM, L.; DE MARTINIS, E. C. P. *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. **Food Microbiology**, v. 68, p. 16–23, dez. 2017. DOI [10.1016/j.fm.2017.06.012](https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.012).

42. PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; CASTRO, R.; POSADA-IZQUIERDO, G. D.; VALERO, A.; CARRASCO, E.; GARCÍA-GIMENO, R. M.; ZURERA, G. Evaluation of hygiene practices and microbiological quality of cooked meat products during slicing and handling at retail. **Meat Science**, v. 86, n. 2, p. 479–485, out. 2010. DOI [10.1016/j.meatsci.2010.05.038](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.038).

43. PORTNOY, D. A.; CHAKRABORTY, T.; GOEBEL, W.; COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 4, p. 1263–1267, abr. 1992. DOI [10.1128/iai.60.4.1263-1267.1992](https://doi.org/10.1128/iai.60.4.1263-1267.1992).

44. POSSAS, A.; HERNÁNDEZ, M.; ESTEBAN-CARBONERO, Ó.; VALERO, A.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. *Listeria monocytogenes* survives better at lower storage temperatures in regular and low-salt soft and cured cheeses. **Food Microbiology**, v. 104, p. 103979, jun. 2022. DOI [10.1016/j.fm.2022.103979](https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.103979).
45. RADOSHEVICH, L.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 32–46, 1 jan. 2018. DOI [10.1038/nrmicro.2017.126](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.126).
46. RAHN, W. M.; GOLLUST, S. E.; TANG, X. Framing Food Policy: The Case of Raw Milk: Framing Food Policy. **Policy Studies Journal**, v. 45, n. 2, p. 359–383, maio 2017. DOI [10.1111/psj.12161](https://doi.org/10.1111/psj.12161).
47. REGUILLO, L.; HERNÁNDEZ, M.; BARRIENTOS, E.; PEREZ-RODRIGUEZ, F.; VALERO, A. Evaluation of the Influence of Frequency of Milk Collection and Milking Dayshift on the Microbiological Quality of Raw Milk. **Journal of Food Quality**, v. 2018, p. 1306107, 21 maio 2018. DOI [10.1155/2018/1306107](https://doi.org/10.1155/2018/1306107).
48. ROCOURT, J.; BOERLIN, P.; GRIMONT, F.; JACQUET, C.; PIFFARETTI, J.-C. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a Single Species, *Listeria grayi*, with a Revised Description of *Listeria grayi*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 1, p. 171–174, 1 jan. 1992. DOI [10.1099/00207713-42-1-171](https://doi.org/10.1099/00207713-42-1-171).

49. RODRIGUEZ, C.; TAMINIAU, B.; GARCÍA-FUENTES, E.; DAUBE, G.; KORSACK, N. *Listeria monocytogenes* dissemination in farming and primary production: Sources, shedding and control measures. **Food Control**, v. 120, p. 107540, 1 fev. 2021. DOI [10.1016/j.foodcont.2020.107540](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107540).
50. RUUSUNEN, M.; SALONEN, M.; PULKKINEN, H.; HUUSKONEN, M.; HELLSTRÖM, S.; REVEZ, J.; HÄNNINEN, M.-L.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; LINDSTRÖM, M. Pathogenic Bacteria in Finnish Bulk Tank Milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 2, p. 99–106, fev. 2013. DOI [10.1089/fpd.2012.1284](https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1284).
51. WHITMAN, K. J.; BONO, J. L.; CLAWSON, M. L.; LOY, J. D.; BOSILEVAC, J. M.; ARTHUR, T. M.; ONDRAK, J. D. Genomic-based identification of environmental and clinical *Listeria monocytogenes* strains associated with an abortion outbreak in beef heifers. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 70, 22 fev. 2020. DOI [10.1186/s12917-020-2276-z](https://doi.org/10.1186/s12917-020-2276-z).
52. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Estimating the burden of foodborne diseases. 2022. <https://www.who.int/activities/estimating-the-burden-of-foodborne-diseases>.
53. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Estimating the Burden of Foodborne Diseases: a practical handbook for countries: a guide for planning**, implementing and reporting country-level burden of foodborne

disease. Geneva: World Health Organization, 2021.
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/341634>.

54. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2018 South Africa. Geneva, 2018. <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/02-may-2018-listeriosis-south-africa-en>.

55. WU, S. Invasion. *In*: TANG,Y.W et al. (ed.). **Molecular Medical Microbiology**. [S. l.]: Elsevier, 2015. v. 1, cap. 25, p. 423–448. DOI [10.1016/B978-0-12-397169-2.00025-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00025-1).