



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



PRODUÇÃO DE BIOFILME POR *Listeria monocytogenes* ISOLADAS DE DIFERENTES ALIMENTOS.

ERIKA CAROLINA ROMÃO BONSAGLIA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, área de concentração
Biologia de parasitas e micro-organismos.

Vera Lúcia Mores Rall

**BOTUCATU – SP
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PRODUÇÃO DE BIOFILME POR *Listeria monocytogenes*
ISOLADAS DE DIFERENTES ALIMENTOS.

ERIKA CAROLINA ROMÃO BONSAGLIA

VERA LUCIA MORES RALL

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, área de concentração
Biologia de parasitas e micro-organismos.

Vera Lúcia Mores Rall

**BOTUCATU – SP
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Bonsaglia, Erika Carolina Romão

Produção de biofilme por *Listeria monocytogenes* isoladas de diferentes alimentos / Erika Carolina Romão Bonsaglia. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Vera Lucia Mores Rall

Capes: 21201005

1. Listeria. 2. Biofilme. 3. Temperatura.

Palavras-chave: Biofilme; *Listeria monocytogenes*; Temperaturas.

*Aos meus Pais
Lucia e Benedito,
Por serem o alicerce desta conquista.*

*A minha filha
Heloisa.*

*Ao meu marido
Rafael,
Pelo amor, por todo incentivo e apoio,
essenciais para realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, força, oportunidade, por me fazer sentir sua presença nos momentos difíceis e nunca deixar desistir dos meus sonhos.

À minha filha Heloisa, pelos sorrisos e abraços que carregam minhas energias e me dão forças para continuar.

À prof^{ra}. Dra. Vera Lucia, minha orientadora e amiga, por me conceder a oportunidade deste trabalho, pelos ensinamentos, paciência, pelos bons exemplos de conduta e ética profissional e por ser um exemplo a ser seguido.

À minha avó Maria de Lourdes (in memoriam), por sempre me incentivar nos estudos.

Aos meus irmãos Fernando e Wesley, por acreditarem em mim e me apoiarem.

À minha querida amiga Gislayne, sempre presente em todos os momentos importantes de minha vida, como fonte de estímulo e como exemplo de ser humano, minha eterna amizade e gratidão.

Ao professor Ary Fernandes Junior, pela amizade e por todas as contribuições e considerações pertinentes para realização deste trabalho.

À minha amiga Patrícia, pela companhia e colaboração para execução deste trabalho.

Aos amigos do laboratório, Natália, Ivana, Débora, Manu, Renata, Ana, Paulo, Bruna pela convivência e pelos momentos de alegria.

Aos funcionários do departamento de Microbiologia/Imunologia pela ajuda e atenção.

E a todas as pessoas que estiveram presentes, embora não nomeadas individualmente, que me apoiaram e contribuíram para realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

*A mente que se abre a uma nova
idéia jamais volta ao seu
tamanho original*

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	02
INTRODUÇÃO	03
OBJETIVOS	10
CAPÍTULO 1	11
Título	12
Resumo	13
Abstract	14
Introdução	15
Material e Métodos	16
Resultados	20
Discussão	24
Conclusão	26
Referências	27
CAPÍTULO 2	30
Título	31
Resumo	32
Abstract	33
Introdução	34
Material e Métodos	35
Resultados e Discussão	37
Conclusão	39
Referências	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

RESUMO

Listeria monocytogenes é uma bactéria frequentemente encontrada em vários alimentos crus, como carne, queijo e legumes. Está amplamente distribuída no ambiente causando a contaminação de alimentos durante seu processamento. Atualmente, a contaminação por *L. monocytogenes* nas indústrias alimentícias é considerada um dos maiores problemas de segurança alimentar, pois uma vez presente na linha de processamento a bactéria dificilmente é eliminada pela grande capacidade em formar biofilme. A formação de biofilmes em equipamentos pode levar a sérios problemas de higiene e perdas econômicas devido à deterioração dos alimentos e deficiência dos equipamentos. Além disso, a contaminação por patógeno representa um grande risco para saúde. A incidência de listeriose é baixa, mas a taxa de letalidade é alta. Muitos dos focos principais de listeriose têm sido associados ao consumo de alimentos contaminados, especialmente os produtos lácteos. Assim, esse trabalho teve como objetivo analisar a capacidade de formação de biofilme, por 32 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de diferentes alimentos, em diferentes materiais (aço inoxidável, vidro e poliestireno) e temperaturas (4°, 20°, 35°C) observando a presença do gene *luxS* e também testar a eficácia de dois sanitizantes alcalino clorado, utilizados para sanitização de planta de processamento de alimentos. Os resultados demonstraram que entre as 32 cepas testadas 25 (78,1%) foram positivas para o gene *luxS* e a bactéria foi capaz de produzir biofilme em todos os materiais e temperaturas testadas, apresentando maior frequência de cepas produtoras nos materiais hidrofílicos (96,7% vidro e 95,6% inox) do que no hidrofóbico (28%). Os testes com sanitizantes mostraram que as concentrações recomendadas podem ser eficazes desde que utilizados em tempo mínimo de 30 minutos para o produto A e 15 para o produto B que levou a eliminação da população de 16 (50%) das 32 cepas testadas. Pode-se concluir que gene *luxS* pode estar envolvido no processo de regulação da formação do biofilme, porém não deve ser o único, uma vez que as cepas negativas para *luxS* também foram produtoras. *L. monocytogenes* foi capaz de formar biofilme em diferentes superfícies independente da temperatura, porém a composição da superfície pode ser um fator preponderante para um desenvolvimento mais eficiente do biofilme. Os agentes sanitizantes não foram eficientes em metade das cepas testadas, mesmo estas estando em suspensão. Esses resultados são preocupantes, pois esta bactéria tende a apresentar resistência ainda maior quando encontrada na forma de biofilme.

Palavras chaves: *Listeria monocytogenes*, *luxS* biofilme, temperaturas, sanitizantes

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is frequently found in many raw foods such as meat, cheese and vegetables, is widely distributed in the environment causing contamination of food during processing. Currently, contamination by *L. monocytogenes* in food is considered a major food security problems, because once present in the processing line, this bacteria is hardly eliminated by the great ability to form biofilm. The formation of biofilms on equipment can lead to serious health and economic losses due to spoilage and disability equipment. Furthermore, contamination pathogen is a great risk to health. The listeriosis incidence is low, but the fatality rate is high. Many of the main focuses of listeriosis have been linked to consumption of contaminated food, especially dairy products. Thus, this study aimed to analyze 32 strains of *L. monocytogenes* isolated from different foods to form biofilms on different materials (stainless steel, glass and polystyrene) and temperatures (4 °, 20 °, 35 ° C) for the presence of the gene *luxS* and also test the effectiveness of two sanitizers alkaline chlorine used to sanitize the plant food processing. The results showed that the strains tested 25 (78.1%) were positive for the gene and the bacterium was able to produce biofilm in all materials and temperatures tested, with higher frequency of hydrophilic materials in producing strains (96.7% glass and 95.6% stainless) than in the hydrophobic (12.4%). The tests show that the sanitizing recommended concentrations may be effective if used in minimum time of 30 minutes for the product A and 15 for the product B has led to the elimination of 16 (50%) of the strains tested. We conclude that the gene *luxS* may be involved in the regulation of biofilm formation, but shouldn't be the only one, once *luxS*-negative strains were also producers. We conclude that *L. monocytogenes* is capable of forming biofilm on different surfaces independent of temperature, but the surface composition may be an important factor for a more efficient development of biofilm. The sanitizers was not efficient in a half of the tested strains, even if they were in suspension. It should be a problem since this bacteria can increase its resistance, when found in a biofilm form.

Key words: *Listeria monocytogenes*, *luxS*, biofilm, temperatures, sanitizers

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é um importante patógeno alimentar responsável por causar surtos de listeriose em humanos e animais (RIBEIRO et al. 2006). Segundo Long et al. (2008), aproximadamente 2500 pessoas ficam doentes devido à infecção por *L. monocytogenes* por ano nos Estados Unidos, com cerca de 500 (20%) óbitos.

A primeira descrição de *Listeria* foi feita por Murray et al. (1926), que relataram uma infecção espontânea em coelhos e cobaias de um laboratório no biotério da Universidade de Cambridge e denominaram o agente como *Bacterium monocytogenes*, em virtude da infecção ser caracterizada por uma monocitose (SALAMANO et al., 2005). No ano seguinte, Pirie (1927), estudando uma epizootia em roedores na África do Sul, isolou de fígado desses animais uma bactéria que recebeu a denominação de *Listerella hepatolytica*, em homenagem ao cientista e cirurgião britânico Joseph Lister (1827-1912), que estudou infecção séptica pós-operatória. Finalmente, em 1940, o micro-organismo foi caracterizado de forma definitiva como *Listeria monocytogenes* (HOFER & REIS, 2005).

Espécies de listeria estão distribuídas no ambiente, podendo ser isoladas do solo, plantas, vegetação em decomposição e silagem (QUINN et al., 2005). O gênero *Listeria* compreende as espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, incluindo duas novas espécies que foram identificadas em 2009, *L. marthii*, *L. rocourtiae* (GRAVES et al., 2010; LECLERCQ et al., 2009). Apenas duas espécies do gênero são geralmente consideradas patogênicas, *L. monocytogenes* em humanos e *L. ivanovii* em outros mamíferos (CUMMINS et al., 1994).

Existem 13 diferentes sorotipos de *L. monocytogenes*, mas somente três (1/2a, 1/2b, 4b) tem sido frequentes isolados em doenças humanas. (NADON et al., 2001; GRAY et al., 2004).

Wiedmann et al (1997) sugeriram a classificação em três grupos distintos, com base em modelos de ribotipagem e alelos dos genes de virulência, a listeriolisina O (hly), Acta (actA) e internalina A (inlA). Segundo esses autores, o grupo I englobaria a maior parte das cepas isoladas em caso de listeriose humana; o grupo II as cepas isoladas tanto de humanos quanto de animais e o grupo III seria formado por cepas que raramente estão envolvidas em casos de listeriose em humanos.

As cepas do grupo I e II são de ocorrência ampla em plantas de processamento de alimentos, enquanto as cepas do grupo III não são comuns nesses ambientes. (NORTON et al., 2001).

As cepas de *L. monocytogenes* pertencentes aos sorotipos 1/2b, 3b, 3c e 4a são classificadas no grupo I enquanto os sorotipos 1/2a, 1/2c e 3a são classificados no grupo II. O grupo III engloba as cepas 4a e 4c. (NADON et al., 2001; GRAY et al., 2004).

Listeria monocytogenes é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio facultativo, não esporulado, mesófilo com caráter psicrotrófico e relativamente resistente ao sal, secagem e pH baixo (SEELINGER & JONES, 1986). Possui ainda, a capacidade de formar biofilme (GANDHI & CHIKINDAS, 2007).

A listeriose é uma infecção causada por *Listeria monocytogenes* que ocorre em todo o mundo, sendo mais frequentemente diagnosticada em seres humanos, que vivem em áreas urbanas nos países desenvolvidos (FAST FACTS, 2006). Essa doença é conhecida há mais de 70 anos, no entanto a transmissão alimentar foi confirmada relativamente a pouco tempo. (WADSWORTH & GOLDFINE, 1999).

Desde 1981, investigações de surtos e casos esporádicos de listeriose indicavam claramente que alimentos contaminados era a fonte mais freqüente de transmissão da doença. Todavia, somente em 1988, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu que o consumo de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* seria a fonte primária de transmissão da listeriose humana. Nos países de clima temperado, ocorre variação sazonal da doença, com maior número de casos nos meses de outono e inverno seguido pela primavera e verão (ROCOURT, 1996). A partir disso, principalmente nos países da Europa Central, pesquisadores passaram a investigar a listeriose como doença de origem alimentar (FABER & PETERKIN, 1991). A incidência de listeriose é baixa, mas a taxa de mortalidade é alta, cerca de 30% (SCHLECH, 1988).

Vasquez-Boland et al. (2001) relataram que a dose de micro-organismo para causar listeriose nas pessoas depende da patogenicidade e virulência da cepa envolvida na infecção, além do fator de risco associado ao hospedeiro. Esses mesmos autores afirmaram que já houve relato de listeriose humana adquirida com a ingestão de apenas 10^2 UFC da bactéria por grama de alimento.

Segundo Bersot (2002), o período de incubação é de 10-20 dias. A sintomatologia causada pela listeriose em humanos inclui uma síndrome parecida com a influenza. Em mulheres grávidas, *L. monocytogenes* pode infectar o feto e causar aborto ou nascimento prematuro. A manifestação neurológica da doença pode ocorrer nos neonatos e em adultos, principalmente nos imunossuprimidos. (QUINN et al., 2005).

Alguns relatos sobre a ocorrência de listeriose no homem também foram feitos no Brasil. No período de abril a dezembro de 1985, foram relatados cinco casos em transplantados renais num mesmo hospital de São Paulo, SP. Os pacientes eram adultos (média de 40,6 anos) tendo como sistema básico a febre. Laboratorialmente, em todos foi encontrada *L. monocytogenes*, dos sorotipos 1/2a 4b. As amostras do sorotipo 4b apresentaram o mesmo perfil de resistência aos antibióticos, sendo resistentes a cefoxitina, clindamicina, oxacilina e penicilina (HOFER et al., 1999). Também no Estado de São Paulo foram relatados dois casos de peritonite bacteriana espontânea por *L. monocytogenes* em pacientes com cirrose (TOYOSHIMA et al., 2006). Em três casos de meningite por *L. monocytogenes*, relatados no Distrito Federal, os pacientes apresentaram febre e dois deles, quadro de convulsão, cefaléia e vômito (HOFER et al., 1998).

A contaminação por *L. monocytogenes* nas indústrias alimentícias é considerada um dos maiores problemas de segurança alimentar (HAMDI et al., 2007). A faixa de crescimento de *L. monocytogenes* é de 4°C a 45°C, o que preocupa a indústria de alimentos, devido ao crescente aumento de alimentos prontos, que devem ser mantidos por tempo considerável em temperatura de refrigeração (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

A presença de *L. monocytogenes* já foi detectada em diversos alimentos de origem animal e vegetal (CHIARINI, 2007). Doyle & Schoeni (1988) estudaram o crescimento desse micro-organismo em vários produtos mantidos em temperatura de refrigeração e verificaram que a bactéria crescia no leite, carnes, ovos, vegetais. *L. monocytogenes* também foi capaz também de se multiplicar em peixes e frutos do mar (carne de caranguejo, camarão e lagosta cozidos) armazenados a 4° e 5°C, podendo apresentar um crescimento de 2 a 3 logs em 1-2 semanas (DORSA et al., 1993).

Araújo (1998) encontrou contaminação por *Listeria* sp. em 80 % das amostras de “blanquet” de peru fatiado e em 90 % das amostras de peito de peru fatiado. Destas, 52 cepas eram *L. monocytogenes*, sendo 51,9%, 34,6%, 7,7%, 5,8%, pertencentes aos sorotipos 4b, 1/2c, 1/2b e 1/2a, respectivamente.

Catão & Ceballos (2001) investigaram a qualidade microbiológica do leite “*in natura*” na linha de produção (leite recém-pasteurizado e leite ensacado) de uma usina de beneficiamento em Campina Grande-PB. Foram analisadas 45 amostras de leite cru, 15 de recém-pasteurizado e 15 ensacado. Observaram que 33 (73,3%) das amostras de leite cru e 9 (30%) das de leite pasteurizado estavam contaminadas com *Listeria* sp., sendo identificadas *L. monocytogenes* em 17 (51,5%) amostras de leite cru e em 9 (100%) de leite beneficiado (4

recém-pasteurizadas e 5 ensacadas). Em relação à diversidade de espécies, nas amostras de leite cru foram encontradas: *L. monocytogenes* (66,6%), *L. innocua* (25,3%), *L. ivanovii* (3,9%), *L. welshimeri* (2,5%) e *L. grayi* (1,5%).

De acordo com os resultados obtidos por Bersot et al. (2001), das 30 amostras de mortadela analisadas, 11 (36,7%) foram positivas para *Listeria spp.*, sendo oito (26,7%) *L. monocytogenes*. Silva et al. (2004) isolaram *Listeria sp.* em 100% das 41 amostras de linguiças mistas do tipo frescal analisadas, *L. innocua* que foi isolada com maior frequência (97,6% das amostras) seguida por *L. monocytogenes* (29,3%) e *L. welshimeri* (24,4%). Samadpor et al. (2006), de um total de 512 amostras de carne moída analisadas através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguido pela confirmação da cultura, 18 (3,5%) foram positivas para *L. monocytogenes*.

Uma vez presente nas fábricas de processamento de produtos de origem animal, as listerias dificilmente são eliminadas da indústria, pela capacidade de formar biofilme. (PARIZZI, 1998), pois as condições dos ambientes industriais onde se processam os alimentos, como fluxo de água, concentração ampla de alimentos e a presença de materiais crus, favorecem a aderência bacteriana e o desenvolvimento de biofilmes (GIBSON et al., 1999). Além disso, o pH, o nível de nutrientes e a temperatura podem também ter um papel na taxa de adesão bacteriana a uma superfície (TRACHOO, 2003; YOKOO, 2004).

O biofilme é uma estrutura de múltiplas camadas de células embebidas numa matriz de polímeros orgânicos, que estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza proteica ou polissacarídica, denominados glicocálice (COSTERTON et al., 1999). A presença de flagelos em várias bactérias tem sido indicada como um fator importante no início da fixação de células em uma superfície, com formação de biofilme. Em *L. monocytogenes*, a motilidade flagelar parece ser essencial para impulsionar as células para a superfície antes da adesão (LEMON et al., 2007) e, em condições de fluxo contínuo, a perda da motilidade flagelar resultou em menor fixação inicial mas causou um aumento na formação do biofilme (TODHANAKASEM et al., 2008).

Uma vez formado o biofilme, os nutrientes são presos e encapsulados dentro de uma matriz polimérica aquosa com substâncias extracelulares (EPS), repleto de micro-organismos que proliferam nas superfícies sólidas de vários materiais. (PAN et al., 2006)

Ronner & Wong (1993) e Wirtanen et al. (1996) consideram biofilme o número de células aderidas de 10^5 e 10^3 por cm^2 respectivamente. Andrade et al. (1998) sugeriram que seja necessário um número mínimo de 10^7 células aderidas por cm^2 , já, segundo Marques

(2005), para haver formação de biofilme, a população bacteriana deve estar entre 10^6 e 10^7 UFC/cm², pois valores inferiores a estes poderiam ser indícios apenas de adesão.

Em determinados momentos, os biofilmes sofrem dispersão, liberando micro-organismos que podem colonizar novos ambientes (CARPENTIER & CERF, 1993). O desprendimento é a liberação de células (individuais ou em grupos) de um biofilme em superfície é um evento ativo, regulado fisiologicamente (STOODLEY et al., 2001).

O *quorum-sensing* (QS) pode ser um fator importante para liberação de células maduras do biofilme, que requer complexos mecanismos sequenciais de comunicação dentro das espécies ou interespecies. Existem exemplos de sistemas conservados de QS que controlam a formação de biofilme. Um desses sistemas envolve o gene *luxS* que sintetiza a enzima autoindutora 2 (AI-2). Foi demonstrado a presença do *luxS* e de AI-2 em diversas bactérias gram positivas e que esse sistema está envolvido na formação de biofilme (HARDIE & HEURLIER, 2008).

O papel de *luxS* ainda não está esclarecido para *L. monocytogenes*, foi demonstrado que a inativação de *luxS* resultou em um aumento na formação do biofilme (BELVAL et al., 2006; SELA et al., 2006), mostrando que esse gene pode estar envolvido neste processo.

Entretanto Stoodley et al (2002), o aumento na concentração de uma molécula indutora é responsável pela liberação de enzimas que degradam a matriz de polímeros, resultando no desprendimento de células do biofilme. A densidade celular dependente da regulação pode também desencadear a liberação de enzimas que degradam a matriz, permitindo que a bactéria se disperse do biofilme, quando alcança um alto nível de organismos nas microcolônias.

A formação de biofilmes em equipamentos pode ocasionar sérios problemas de higiene e perdas econômicas devido à contaminação e deterioração precoce dos alimentos e deficiência dos equipamentos (BREMER et al., 2006; GRAM et al., 2007). Micro-organismos em biofilmes catalisam reações químicas e biológicas causando corrosão do metal em oleodutos e tanques e podem reduzir a eficácia de transferência de calor (MITTELMAN, 1998).

Diferentes cepas de *L. monocytogenes* têm se mostrado capaz de se ligar às superfícies abióticas com diferentes níveis de adesão, independentemente da superfície (vidro, plástico e aço inoxidável) ou temperatura (GAMBLE & MURIANA, 2007).

O aço inoxidável é o material escolhido para superfícies de trabalho na maioria das indústrias de alimentos, devido a diversas propriedades como força mecânica, resistência à

corrosão e durabilidade. O acabamento ou o polimento do aço inoxidável são outras características importantes que justificam seu emprego em equipamentos na área de produção de alimentos (HAYES, 1993). Mesmo assim, as superfícies de aço inoxidável utilizadas em plantas e equipamentos de manipulação, estocagem ou processamento de alimentos, são reconhecidas como as principais fontes de contaminação microbiana (CABEÇA, 2006).

Mafu et al. (1990) e Sasahara & Zotolla (1993) demonstraram a capacidade de *L. monocytogenes* em produzir biofilme em várias superfícies, incluindo aço inoxidável, polipropileno e vidro.

Lundén et al. (2000) estudaram a mesma característica em aço inoxidável e observaram que as cepas pertencentes ao sorotipo 1/2c apresentaram maior capacidade de adesão do que as pertencentes ao sorotipo 1/2b.

Pelos problemas causados pelo biofilme a monitoração e avaliação da efetividade da higienização em ambientes de produção de alimentos constituem um ponto crítico no controle de qualidade higiênico-sanitária. As consequências de um controle ineficiente de higiene podem levar a doenças de origem alimentar, perdas de lotes produzidos e interrupção de processos de produção (HAYES, 1993).

No interior do biofilme os micro-organismos se tornam mais resistentes à ação de agentes físicos (água sob pressão, escovas, etc.) e agentes químicos (detergentes e desinfetantes) utilizados no procedimento de higienização de rotina na indústria de alimento (PARIZZI, 1998).

Os agentes sanificantes visam reduzir, até níveis seguros, os micro-organismos deteriorantes e patogênicos presentes nas superfícies de equipamentos e utensílios que entram em contato com os alimentos, contribuindo para melhoria da qualidade microbiológica de alimentos, promovendo a segurança necessária prevista pelas regulamentações sanitárias (ANDRADE & MACEDO, 1996).

A higienização dos equipamentos e superfícies consiste na limpeza e sanitização. A limpeza consiste na eliminação da maior quantidade possível de resíduos de alimentos e a sanitização, em destruir a maior parte dos micro-organismos das superfícies (HOFFMANN et al., 2002). Conforme Huss (1997), numerosos casos de alteração de produtos alimentares e de contaminação inaceitável por bactérias patogênicas, têm sido atribuídos a falhas ou insuficiências desses procedimentos. O processo de higienização será mais eficiente quanto maior for o tempo de contato entre agente sanificante e superfície, porém as reações ocorrem mais eficazmente nos minutos iniciais da aplicação dos agentes químicos. Processos de

higienização prolongados tornam as soluções saturadas aumentando o custo do procedimento (ANDRADE & MACEDO, 1996). Então, o conhecimento dos tipos de agentes de limpeza e suas ações propiciam a escolha correta para se obter o resultado esperado (CONTRERAS et al., 2003).

Os compostos clorados, iodados e à base de ácido peracético são comumente empregados como sanitizantes em indústrias devido a suas características oxidantes, apresentando um amplo espectro biocida (CHMIELEWSKI & FRANK, 2003). Muitos desses agentes de desinfecção têm se mostrado eficazes contra células *L. monocytogenes* em suspensão, (AARNISALO et al., 2000). Porém, a natureza da estrutura do biofilme e os atributos fisiológicos dos organismos do biofilme conferem uma resistência natural aos agentes antimicrobianos (DONLAN & CONTERSTON, 2002).

Em estudo realizado por Somers & Wong (2004), avaliando a eficácia de sanificantes frente à formação de biofilme de *L. monocytogenes*, observou-se que, na maioria das superfícies amostradas (aço inox, borracha e poliéster), nenhuma bactéria foi detectada após a aplicação de hipoclorito de sódio.

Devido à frequente contaminação de alimentos prontos para o consumo por *L. monocytogenes* e considerando a capacidade dessa bactéria formar biofilme, é de interesse avaliar em qual tipo de material e em qual temperatura ocorre a formação de biofilme.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar a capacidade de formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* isolada de diferentes alimentos (laticínios e vegetais) e do ambiente (indústria de alimentos) em materiais utilizados em plantas de processamento de alimentos (aço inox, vidro e poliestireno) em diferentes temperaturas.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar a ocorrência do gene *luxS*, um dos genes reguladores envolvidos na síntese de polissacarídeos de biofilmes em *Listeria monocytogenes*, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).
- Verificar a ocorrência a formação de biofilme por cepas de *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável, vidro e poliestireno.
- Analisar a formação de biofilme por *L. monocytogenes* em diferentes tempos e temperaturas
- Analisar a eficácia de dois sanitizantes alcalino clorado frente a cepas de *L. monocytogenes* em suspensão.

CAPÍTULO 1

Este trabalho deu origem ao artigo “Production of biofilms by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures.” que foi submetido para publicação na revista “Food Control”.

PRODUCTION OF BIOFILM BY *Listeria monocytogenes* IN DIFFERENT MATERIALS AND TEMPERATURES.

Bonsaglia, E.C. R.^a, Araújo Junior, J. P.^a, Tsunemi, M. H.^b, Rall, V.L.M.^{a*}

a

Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, Sao Paulo, State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

b

Department of Biostatistics, Institute of Biosciences, Sao Paulo, State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

*Corresponding author:

Vera Lucia Mores Rall

Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, UNESP- University Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Botucatu, São Paulo, Brazil.

Caixa Postal 510 CEP:18618-000, Distrito de Rubião Junior., s/n.

Tel. (+5514) 3811-6240, Fax (+5514) 3811-6240

Email: vlmores@ibb.unesp.br

RESUMO

Produção de biofilme por *Listeria monocytogenes* em diferentes materiais e temperaturas.

Considerada um dos patógenos veiculados por alimentos mais importantes, *Listeria monocytogenes* é facilmente encontrada em superfícies, principalmente na forma de biofilme. Biofilmes são agregados de células que facilitam a persistência desses patógenos em ambientes de processamento de alimentos conferindo resistência aos processos de higienização e podendo causar contaminação dos alimentos durante o processamento, representando um perigo a saúde da população. Pouco se conhece sobre a dinâmica de formação e regulação da produção de biofilme em *Listeria monocytogenes*, mas vários autores relataram que o gene *luxS* pode ser um dos precursores na formação dessa substância. Assim, 32 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de diferentes alimentos foram analisadas quanto à presença desse gene a capacidade de formar biofilme em três superfícies frequentemente usadas em indústria de alimentos (poliestireno, vidro e aço inoxidável) em diferentes temperaturas (4°, 20° e 35°C). Das 32 cepas testadas 25 (78,1%) foram positivas quanto à presença do gene *luxS*, porém todas as cepas produziram biofilme em pelo menos uma das temperaturas e materiais testados, mostrando que esse gene pode estar envolvido, mas não é o único responsável pela sua produção, podendo outros genes participarem desse processo. Com relação aos materiais testados, observou-se que a bactéria aderiu melhor às superfícies hidrofílicas (aço inox e vidro) do que à superfície hidrofóbica (poliestireno). O tempo de incubação representou um fator importante nesse processo de formação de biofilme, pois os resultados mostraram um decréscimo na produção em 35°C em aço inox e vidro a partir de 48 horas. Podemos concluir que *L. monocytogenes* é capaz de formar biofilme em diferentes superfícies independente da temperatura, porém a composição da superfície pode ser um fator preponderante para um desenvolvimento mais eficiente do biofilme.

Palavras chaves: Biofilme, *luxS*, *Listeria monocytogenes* e temperaturas,

ABSTRACT

Production of biofilms by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures.

Considered from a food-borne pathogens most important, *Listeria monocytogenes* is easily found on surfaces, particularly in the form of biofilm. Biofilms are aggregates of cells that facilitate the persistence of these pathogens in food processing environments conferring resistance to the processes of cleaning and may cause contamination of food during processing, representing a danger to public health. Little is known about the dynamics of the formation and regulation of biofilm production in *Listeria monocytogenes*, but several authors reported that the *luxS* gene may be a precursor in the formation of this substance. Thus, 32 strains of *L. monocytogenes* isolated from different foods were analyzed for the presence of this gene and the ability to form biofilm on three surfaces often used in food industry (polystyrene, glass and stainless steel) at different temperatures (4 °, 20 ° and 35 ° C). Of the 32 strains tested 25 (78.12%) were positive for the presence of the gene *luxS*, but all strains produced biofilm in at least one of temperatures and materials tested, showing that this gene may be involved, but it is not solely responsible for its production, other genes may participate in this process. With respect to the materials tested, it was observed that the bacteria adhered better to hydrophilic surfaces (stainless steel and glass) than the hydrophobic surface (polystyrene). The incubation time was an important factor in the process of biofilm formation, because the results showed a decrease in output at 35 ° C on stainless steel and glass at 48 hours. We conclude that *L. monocytogenes* is capable of forming biofilm on different surfaces independent of temperature, but the surface composition may be important factor for a more rapid development of biofilm.

Keywords: Biofilm, *luxS*, *Listeria monocytogenes*, temperatures.

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é um patógeno mesófilo de caráter psicrotrófico gram-positivo envolvido em vários surtos de doenças transmitidas por alimentos (WILKS et al, 2006;. GANDHI & CHIKINDAS, 2007). Células de *L. monocytogenes* podem se fixar em diversas superfícies, especialmente nas partes inacessíveis de equipamentos industriais (PAN et al, 2006;. RIBEIRO et al, 2006). Por produzirem biofilme podem se fixar rapidamente no substrato e, uma vez aderidas, são de difícil remoção (FRANK & KOFFI, 1990). *L. monocytogenes* já foi encontrada em biofilmes em superfícies de plástico, polipropileno, borracha, aço inoxidável e vidro (JEONG & FRANK, 1994).

O gene *luxS* é responsável pela produção da molécula autoindutora 2 (AI-2), que está envolvida na resposta *quorum-sensing* de *Vibrio harveyi*, sendo encontrada em várias bactérias gram-negativas e positivas e, por isso, é considerada um sinalizador na comunicação entre espécies (BASSLER et al. 1994). Belval (2006) concluiu que *L. monocytogenes* também produz moléculas de AI-2 e o gene *LuxS* pode estar envolvido no processo de regulação na formação de biofilme.

A adesão de bactérias às superfícies é influenciada pelas propriedades físico-químicas do ambiente (temperatura e pH), superfície (hidrofobicidade) e características da bactéria como a motilidade (MOLTZ & MARTIN 2005; FOLSOM et al. 2006).

Fatores ambientais como a temperatura podem regular genes relacionados com a virulência ou com estruturas que resultam em alterações na superfície celular, que podem afetar a aderência, com a formação de flagelo em *L. monocytogenes* (LEIMEISTER-WACHTER et al. 1992; LIU et al. 2002).

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de 30 cepas de *L. monocytogenes* e isoladas de ambiente e de diferentes alimentos (vegetais e leite) e 2 cepas padrão (ATCC 7644 e 16313), em formar biofilme superfícies hidrofóbicas (poliestireno) e hidrofílicas (vidro e aço inoxidável), em diferentes temperaturas (4°, 20° e 35° C).

2. MATERIAL e MÉTODOS

2.1. Obtenção das amostras

Foram utilizadas 30 cepas previamente identificadas, isoladas de leite, vegetais e ambiente de processamento, cedidas pelos laboratórios de Microbiologia de Alimentos da UNESP/ Botucatu e pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Além disso, foram utilizadas 2 cepas padrão (ATCC 7644 e 16313).

2.2. Análise por PCR do gene *inlA* e *luxS*

2.2.1 Extração e Purificação de DNA

Cada cepa de listeria foi inoculada em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) a 37°C/24 h e 300 µL foi transferido para tubos de microcentrifuga, submetido à extração e purificação do DNA, empregando-se o kit comercial “MiniSpin” (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante.

O tubo foi centrifugado a 13.000 / 30 seg (Eppendorf 5415R), o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 40 µl de tampão de lisozima e 10 µL lisozima, o tubo foi homogeneizado e mantido em temperatura ambiente por 15 minutos, com homogeneização ocasional. A seguir, foram adicionados 10 µL de proteinase K, homogeneizado e incubado a 55°C/ 15 minutos. A seguir, foram adicionados 500 µL de solução de extração, homogeneizado e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Todo volume foi transferido para uma coluna e centrifugado a 8.000 rpm/1 minuto. O volume filtrado foi descartado e novamente foram adicionados 500 µL de solução de extração na coluna que foi centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto, descartando-se o volume filtrado. Em seguida, foram adicionados 500 µL de solução de lavagem e centrifugado a 12.000 rpm por 3 minutos, com descarte do filtrado. A coluna foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, com adição de 200 µL de solução de eluição (água Milli Q autoclavada e previamente aquecida a 56°C em banho-maria), incubado à temperatura ambiente por 1 minutos e centrifugado a 8.000 rpm durante 1 minuto. A amostra foi congelada a - 20°C até o momento do uso para a reação em cadeia pela polimerase (PCR).

2.3. Amplificação do ácido nucléico (PCR)

O volume de 25 µL foi composto por 2,5 µL de PCR Buffer 10x (Invitrogen), 0,75 µM de Cloreto de Magnésio (Invitrogen), 200 µl de cada dNTP, 1 U de Taq DNA Polimerase, 10 picomoles de cada primer (Quadro 1), água ultrapura autoclavada (qsp) (Milli-Q Plus, Millipore) e 3 µL da amostra de DNA. A incubação foi realizada em Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystem) empregando-se os parâmetros de um ciclo inicial a 94°C durante 5 minutos para desnaturação inicial, seguidos por 35 ciclos com 94°C/30s, 60°C/30s e 72°C/30s. A temperatura de extensão final foi de 72°C por 4 minutos. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água ultrapura. Como controle positivo, foram utilizadas duas cepas padrão de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e ATCC 16313 (ARNOLD et al., 2004).

Quadro 1: Oligonucleotídeos e suas propriedades utilizados na confirmação da espécie *L. monocytogenes* e na detecção de gene regulador.

Sequência		T°C	Pb
		anelamento	
<i>luxS</i>	TCCGCAAGCTCTTTTGCGCCT		
	TGTTTTAGCGAAGACTTTAGCCGATGT	57,5	117
<i>inlA</i>	AATCTAGCACCCTGTCGGG		
	TGTGACCTTCTTTTACGGGC	50	733

Pb: pares de bases; T°C: temperatura em graus centígrados

Os primers do gene *luxS* foram desenhados utilizando o programa Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>) e os do gene *inlA*, foram desenhados de acordo com Rosseaux et al. (2004).

2.4. Visualização dos produtos amplificados

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese (Electrophoresis Power Supply Model EPD 600 – Amersham-Pharmacia Biotech Inc.®) em gel de agarose 1,5% em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com SYBR Green (2µl 10x/0,8µL de amostra - Invitrogen®). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA de 50 ou 100 bp, sendo analisados e fotografados

em analisador de imagens (AlphaImager – Alpha esasy FC Software – AlphaInotech Corporation®).

2.5. Verificação e quantificação da produção de biofilme

A produção de biofilme foi verificada em três materiais diferentes, o aço inoxidável, o vidro e poliestireno. As temperaturas utilizadas foram 35°C, temperatura ótima de crescimento de listeria, 20°C, temperatura que esse micro-organismo apresenta flagelo, que parece estar envolvido na produção de biofilme e a 4°C, temperatura de alimentos refrigerados.

2.5.1. Preparo das placas

Foram utilizados fichas de aço inox (1 cm de diâmetro) e lamínulas de vidro(1,3 cm de diâmetro esterilizadas) que foram colocadas na placa de 24 poços.

2.5.2. Preparo da cultura e inoculação na placa

As cepas de listeria foram incubadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) a 35°C/24h. A seguir, a cultura foi diluída até 10^8 UFC de bactérias, com o auxílio do Densichek (Biomérieux). Alíquotas de 300 µL dessa diluição foram distribuídas, em triplicata, nas cavidades da placa e incubadas nas 4 temperaturas estabelecidas, por 72 horas sendo o meio de cultura renovado a cada 24 horas.

2.5.3. Quantificação da produção de biofilme em materiais hidrofílicos (vidro e aço inoxidável)

As fichas foram transferidas para uma nova placa, a fim de se evitar a quantificação de biofilme eventualmente produzido no plástico, ao redor das fichas de diferentes materiais. A seguir as fichas foram lavadas três vezes, com solução tampão (PBS, pH 7,4), para a remoção das células não fixadas e coradas com violeta cristal 1%, por 15 minutos. O corante foi removido e a placa, novamente lavada. O biofilme foi ressuspensionado em 300 µl de ácido acético glacial, por 15 minutos, que assegura a homogeneidade do material corado. Um volume de 200 µl foi transferido para um microplaca de 96 poços, lida em um leitor de ELISA (Babsystems, MultiSkan EX), em 570 nm. BHI não inoculado foi utilizado como branco, para corrigir o valor da absorbância.

A produção de biofilme foi classificada de acordo com Stepanovic et al. (2000), no quadro 2, em não produtor, fraco produtor, moderado e forte produtor, de acordo com a fórmula:

Quadro 2: Classificação da produção de biofilme

$ODc \leq ODcp$ = não produtor

$ODcp < ODc \leq (2 \times ODcp)$ = fraco produtor

$(2 \times ODcp) < ODc \leq (4 \times ODcp)$ = moderado produtor

$(4 \times ODcp) \leq ODc$ = forte produtor

ODc: D.O do controle negativo

Fonte: Stepanovic et al. (2000)

ODcp: D.O da cepa em teste

2.6. Formação de Biofilme em material hidrofóbico (microplaca de poliestireno)

Cada cepa foi semeada em BHI e incubada a 37°C/24h e diluída a 10^8 UFC (escala 0,5 de MacFarland). Uma alíquota de 200 µl foi plaqueada, em quadruplicata, em microplaca de 96 poços, com fundo chato. As cepas de *L. monocytogenes* foram incubadas por 24, 48 e 72 horas, sem agitação. Após período de incubação, a placa foi lavada três vezes, com solução salina tamponada (PBS, pH 7,4), seca à temperatura ambiente e corado com cristal violeta 1%, por 15 minutos. Após três lavagens com água destilada e secagem em temperatura ambiente, foi colocada em um leitor de ELISA (Babsystems, MultiSkan EX), com leitura a 570 nm. BHI não inoculado foi o branco, utilizado para corrigir o valor da absorbância, cujo valor foi uma média dos quatro poços. As cepas que apresentaram valores maiores que 0,1 foram consideradas produtoras de biofilme (VASUDEVAN et al., 2003).

3. RESULTADOS

3.1 PCR dos genes *inlA* e *luxS*.

Todas as amostras previamente identificadas como *Listeria monocytogenes* foram confirmadas, através da técnica de PCR, com a pesquisa do gene *inlA* (Figura 1).

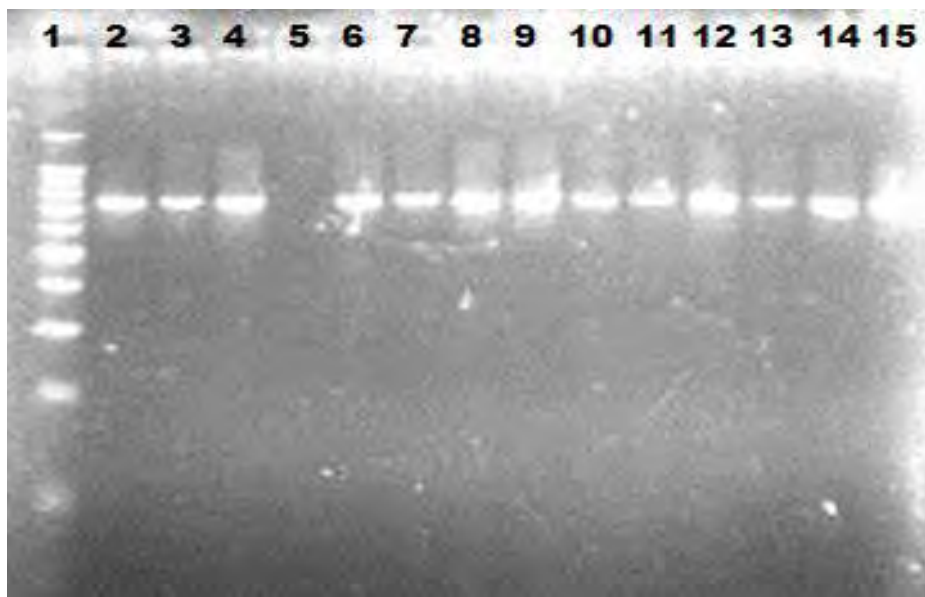


Figura 1: Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *inlA*. Poço 1: marcador de 100 pb; poços 2 e 3: *L. monocytogenes* ATCC 7644 e 16313; 4: cepa positiva; 5: controle negativo; 6 ao 15: amostras positivas.

Foram realizadas as reações da PCR na pesquisa do gene *luxS* e ,das 32 cepas, 25 (78,1%) foram positivas (Figura 2).

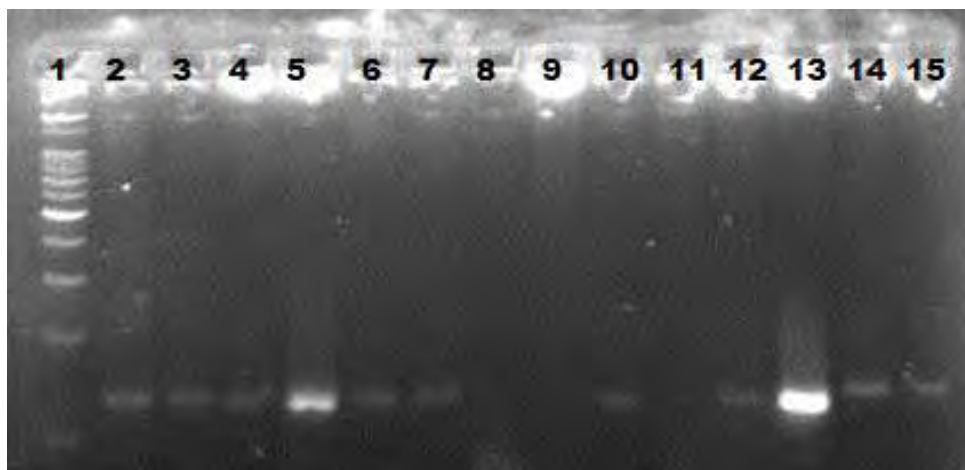


Figura 2: Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *luxS*. Poço 1: marcador de 100 pb; poços 2 e 3: *L. monocytogenes* ATCC 7644 e 16313; 8: controle negativo; poços restantes: amostras testadas.

3.2. Avaliação da formação de Biofilme

3.2.1. Produção de Biofilme em materiais hidrofílicos (aço inox e vidro)

3.2.1.1. Testes a 4°C

Segundo a Tabela 1, ocorreu a formação de biofilme aço inox em 24 horas em 20 (62,5%) das 32 cepas testadas, produziram biofilme. Após 48 horas ocorreu um aumento para 28 (87,5%) e em 72 horas para 27 (84,3%).

Nos testes com lâminas de vidro, os resultados mostraram que, nas primeiras 24 horas de incubação 15 (46,8%) das cepas produziram biofilme, que aumentou para 25 (78,1%) após 48h e em 72 h 26 (81,3%).

Pelo teste do Qui-Quadrado, pode ser observado que não ocorreram diferenças estatísticas em relação à produção de biofilme nos materiais e temperaturas testados, com exceção da maior produção em aço inox em relação ao vidro, a 35°C/72h.

Tabela 1: Formação de biofilme por *L. monocytogenes* em aço inoxidável e vidro em diferentes tempos e temperaturas.

Temperatura	Momento	Inox (%)	Vidro (%)	p-valor
4°C	24h	62,5	46,9	0,315
	48h	87,5	78,1	0,509
	72h	84,4	81,3	1,000
20°C	24h	93,8	81,3	0,257
	48h	87,5	81,3	0,732
	72h	96,9	81,3	0,104
35°C	24h	93,8	84,4	0,426
	48h	62,5	37,5	0,079
	72h	81,3	34,4	<0.001

3.2.1.2. Testes a 20°C

Quando analisada a produção de biofilme em aço inoxidável, numa temperatura de 20°C, os resultados mostraram que das 32 cepas analisadas, 30 (93,8%) produziram biofilme e às 48h e 72 horas de incubação os valores foram 28 (87,5%) e 31 (96,9%) respectivamente.

Nos testes realizados com lâminas de vidro, 26 (81,3%) das cepas produziram biofilme e esse valor se manteve após 48h e 72 horas de incubação.

3.2.1.3. Testes a 35°C

Pela tabela 1 pode se observar que em 24h, em aço inoxidável, 30 (93,8%) das cepas produziram biofilme e que em 48h e 72 horas, a quantidade de cepas produtoras foi reduzida para 20 (62,5%) e para 26 (81,3%) respectivamente.

Nos testes com lamina de vidro em 24 horas, 27 (84,4%) das cepas produziram biofilme, porém quando analisado após 48h e 72 horas esses valores apresentaram um decréscimo para 12 (37,5%).

3.2.2. Produção de biofilme em material hidrofóbico (microplaca de poliestireno)

Para os testes de produção de biofilme em microplaca de poliestireno os resultados mostraram que *L. monocytogenes* não aderiu bem a esse material, pois na temperatura de 4°C em 24 e 48h de incubação, apenas 2 (6,2%) das 32 cepas produziram biofilme (Tabela 2).

Quando analisada a temperatura de 20°C, os resultados não diferiram dos obtidos na temperatura de 4°C.

Na temperatura de 35°C, nas primeiras 24 horas de incubação 2 (6,2%) das cepas produziram biofilme e após 48 horas 4 (12,4%) haviam produzido (Tabela 2).

Nas três temperaturas testadas não ocorreu a formação de biofilme após 72 horas de incubação. Aplicando-se o teste qui-quadrado, não foi possível determinar uma diferença significativa das porcentagens entre as temperaturas em cada tempo.

Tabela 2: Proporção da produção de biofilme por *L. monocytogenes* em poliestireno nos diferentes tempos e temperaturas.

Tempo	Temperatura			p-valor
	4°C	20°C	35°C	
24h	2 (6,2%)	2 (6,2%)	2 (6,2%)	1,000
48h	2 (6,2%)	2 (6,2%)	4 (12,4%)	0,579

Na tabela 3, pode-se observar a relação da porcentagem de produção e o resultado do p-valor correspondente. Pelo teste, conclui-se que há diferença significativa entre as

proporções quando comparado os materiais, mostrando que a formação de biofilme ocorreu em maiores proporções nos materiais hidrofílicos independente da temperatura.

Tabela 3: Comparação da formação de biofilme por *L. monocytogenes* entre os materiais inox e vidro e poliestireno.

Temperatura	Tempo	Inox(%)	Vidro(%)	Poliestireno(%)	p-valor
4°C	24h	62,5	46,9	6,2	<0.001
	48h	87,5	78,1	6,2	<0.001
	72h	84,4	81,3	---	---
20°C	24h	93,8	81,3	6,2	<0.001
	48h	87,5	81,3	6,2	<0.001
	72h	96,9	81,3	---	---
35°C	24h	93,8	84,4	6,2	<0.001
	48h	62,5	37,5	12,4	<0.001
	72h	81,3	34,4	---	---

3.3. Análise do nível de produção de biofilme.

De acordo com Stepanovic et al. (2000), as cepas foram classificadas como não produtoras de biofilme ou com produção fraca, moderada ou forte. O nível de produção variou de acordo com a temperatura e o material analisado, como apresentado na Tabela 4.

Pode-se observar que não ocorreram diferenças estatísticas (p-valor 0,170) entre os diferentes níveis de produção de biofilme, considerando-se as temperaturas e materiais analisados.

Tabela 4: Classificação da produção de biofilme por *L. monocytogenes* em diferentes temperaturas, independentemente do tempo.

Material	T°	NP N (%)	Produtores			
			Fraco N (%)	Moderado N (%)	Forte N (%)	TP N (%)
Inox	4°C	2 (6,2%)	23 (71,9%)	6 (18,7%)	1 (3,1%)	30 (93,8%)
	20°C	1 (3,1%)	23 (71,9%)	7 (21,9%)	1 (3,1%)	31 (96,9%)
	35°C	1 (3,1%)	25 (78,1%)	6 (18,7%)	---	31 (96,9%)
Vidro	4°C	1 (3,1%)	28 (87,5%)	3 (9,4%)	---	31 (96,9%)
	20°C	0	31 (96,9%)	1 (3,1%)	---	32 (100%)
	35°C	2 (6,2%)	25 (78,1%)	5 (15,6%)	---	30 (93,8%)

T°: Temperatura; NP: Não Produtor; TP: Total de Produtores

4. DISCUSSÃO

Listeria monocytogenes tem sido um sério problema na indústria alimentícia devido a sua prevalência nos ambientes de processamentos de alimentos.

No presente estudo analisou-se a formação de biofilme de 32 cepas de *L. monocytogenes* em três temperaturas: 4°C, 20°C e 35°C, uma vez que *L. monocytogenes* tem a capacidade de crescer em uma ampla faixa de temperaturas (2-45°C). Essa característica de conseguir se multiplicar em temperatura de refrigeração é um dos principais fatores que tornam difícil o controle desse patógeno em alimentos refrigerados (ROCOURT & COSSART, 1997).

Essas cepas também foram avaliadas quanto à presença do gene *luxS* e 25 (78,1%) das 32 foram positivas para este gene, um dos envolvidos na regulação da formação de biofilme. Entretanto, segundo Jordan et al. (2008), todos os determinantes genéticos necessários para formação de biofilme em *L. monocytogenes* ainda são desconhecidos.

Diversos materiais como vidro, aço inoxidável, PVC, etc. são utilizados em ambientes de processamento de alimentos, podendo *L. monocytogenes* aderir e colonizar essas superfícies de contato, formando o biofilme (JEONG & FRANK, 1994).

Analisou-se a formação de biofilme em materiais hidrofílicos (vidro e aço inoxidável) e material hidrofóbico (poliestireno), observando-se que a maior porcentagem de cepas de *L. monocytogenes* produtoras de biofilme ocorreu primeiro em vidro e aço inoxidável (96,7% e 95,6%, respectivamente) seguido por poliestireno (28%), independente da temperatura testada. Em 1996, Blackman & Frank analisaram a formação de biofilme em diferentes materiais utilizados na indústria alimentícia, incluindo o poliestireno, demonstrando a capacidade dessa bactéria se fixar e formar biofilme neste material, Sinde & Carballo (2000) também relataram que cepas de *Salmonella* spp e *L. monocytogenes* aderiram em maior número a materiais hidrofóbicos, porém os nossos resultados estão de acordo com o encontrado por Chavant et al. (2002) que observaram uma maior formação de biofilme em superfície hidrofílica do que em hidrofóbica e em ambos materiais *L. monocytogenes* apresentou grande capacidade de colonizar independente da temperatura de incubação.

Chae & Scraft (2000) testaram a formação de biofilme com 13 cepas de *L. monocytogenes* a 37°C em superfície de vidro e observaram que 100% das cepas foram capazes de formar biofilme em até 24 horas de incubação.

Di Bonaventura et al. (2008) testaram 44 cepas de *L. monocytogenes* de origem alimentar e de ambientes na formação de biofilme. Os níveis foram significativamente maiores em vidro, 4° C, 12°C e 22°C, em comparação com poliestireno e aço inoxidável. A 37° C, *L. monocytogenes* produziu biofilme em níveis significativamente mais altos em vidro e aço inoxidável, que no poliestireno.

Como pode ser observado, no aço inox, ocorreu a produção de biofilme em todas as temperaturas testadas ocorrendo decréscimo nessa produção a 35°C, a partir de 48h. Esse decréscimo na produção de biofilme em aço inox também foi observado por Chavant et al. (2002) após 48 horas. Segundo esses autores essa queda pode ter ocorrido devido ao desprendimento das células que antecedem a fase de nova colonização, sendo esse material removido durante o processo de colonização.

Moltz & Martin (2005) analisaram a produção de biofilme em aço inoxidável por 8 cepas de *L. monocytogenes* em 4°, 20° e 37°C e observaram que 100% das cepas produziram biofilme em todas as temperaturas após 20h de incubação.

Em nosso estudo, no vidro, também foi observado uma diminuição na produção a 35°C a partir de 48h, como demonstraram também Sasahara & Zottola (1993) quando analisaram a capacidade de *L. monocytogenes* em aderir a várias superfícies, incluindo aço inoxidável, polipropileno e vidro. A cepa 7148 de *L. monocytogenes* apresentou uma

multiplicação lenta durante os dois primeiros dias de formação de biofilme e continuou aumentando a população até o quarto dia. Segundo os mesmos autores os biofilmes de outras quatro cepas decresceram lentamente após dois dias.

De acordo com a Tabela 3, os resultados mostraram que 93,7% das cepas produziram biofilme dentro de alguma das categorias (fraco, moderado e forte) e esses resultados são semelhantes aos encontrados por Stepanovic et al. (2004) que analisaram a intensidade de produção de biofilme de 48 cepas de *L. monocytogenes* em superfície plástica onde 40 (83,3%) produziram biofilme dentro das mesmas categorias.

Surpreendentemente, não houve uma maior produção de biofilme a 20°C, como esperado, pois nessa temperatura ocorre a expressão de flagelos, importante nos primeiros passos de adesão, que antecede à formação da matriz polissacarídica (LEMON et al., 2007).

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode se concluir que *L. monocytogenes* pode formar biofilmes em diferentes superfícies usadas em plantas de processamento de alimentos e em diferentes temperaturas, inclusive na de refrigeração. Essa situação é preocupante, sendo necessários processos adequados de higiene e sanitização que impeçam sua fixação no ambiente.

5. REFERÊNCIAS

- ARNOLD, T.; SCHOLZL, H. C.; MARG, H.; ROSLER, U.; HENSEL, A. Impact of *invA*-PCR and Culture Detection Methods on Occurrence and Survival of *Salmonella* in the Flesh, Internal Organs and Lymphoid Tissues of Experimentally Infected Pigs. *Journal of Veterinary Medicine B*, v. 51, n.10, p. 459-463, 2004.
- BASSLER, B. L.; WRIGHT, M.; SILVERMAN, M. R. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Molecular Microbiology* v.13, p.273–286, 1994.
- BELVAL, S. C.; GAL, L.; MARGIEWES, S.; GARMYN, D.; PIVETEAU, P.; GUZZO, J. Assessment of the roles of *luxS*, S-ribosyl homocysteine, and autoinducer 2 in cell attachment during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Applied Environmental Microbiology*, v.72, p.2644-2650, 2006.
- BLACKMAN, L.C.; FRANK, J.F. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *Journal of Food Protection*, v. 59, p. 827–831, 1996.
- CHAE, M. S.; SCHRAFT, H. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology*, v.62 p. 103–111, 2000.
- CHAVANT, P.; MARTINIE, B.; MEYLHEUC, T.; BELLON-FONTAINE, M.N.; HEBRAUD, M. *Listeria monocytogenes* LO28: Surface Physicochemical Properties and Ability to Form Biofilms at Different Temperatures and Growth Phases. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 728–737, 2002.
- DI BONAVENTURA, G.; PICCOLOMINI, R.; PALUDI, D.; D'ORIO, V.; VERGARA, A.; CONTER, M.; LANIERI, A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, v.104, p.1552–1561, 2008.
- FOLSOM, J.P., SIRAGUSA, G.R.; FRANK, J.F. Formation of biofilm at different nutrient levels by various genotypes of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* v.69, p. 826–834, 2006.
- FRANK, J.F., KOFFI, R.A. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection*, v. 53, p.550–554, 1990.
- 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, 2007.

- JEONG, D. K., FRANK, J. F. Growth of *Listeria monocytogenes* at 21°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy environments. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v.27, p.415–424, 1994.
- JORDAN, S. J.; PERNI, S.; GLENN, S.; FERNANDES, L.; BARBOSA, M.; SOL, M.; TENREIRO, R. P.; CHAMBEL, L.; BARATA, B.; ZILHAO, L.; ALDSWORTH, T. G.; ADRIAO, A.; FALEIRO, M. L.; SHAMA, G.; ANDREW, P. W. *Listeria monocytogenes* biofilm-associated protein (BapL) may contribute to surface attachment of *L. monocytogenes* but is absent from many field isolates. *Applied Environmental Microbiology* v.74, p.5451–5456, 2008.
- LEIMEISTER-WACHTER, M.; DOMANN, E.; CHAKRABORTY, T. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *Journal of Bacteriology*, v.174, p.947–952, 1994.
- LEMON, K. P., HIGGINS, D. E., KOLTER, R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, v.189, p.4418–4424, 2007.
- LIU, S.; GRAHAM, J. E.; BIGELOW, L.; MORSE, P. D.; WILKINSON, B. J. Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Applied Environmental Microbiology* v.68, n.4, p.1697–1705, 2002.
- MOLTZ, A. G.; MARTIN, S. E. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal Food Protection*, v.68, p.92–97, 2005.
- PAN, Y.; BREIDT, F.; KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and Environmental Microbiology* v.72 (12), p. 7711–7717, 2006.
- RIBEIRO, L. A. O.; RODRIGUES, N. C.; FALLAVENA, L. C. B.; OLIVEIRA, S. J.; Brito, M. A. Listeriose em rebanho de ovinos leiteiros na região serrana do Rio Grande do Sul: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.3, 316–319, 2006.
- ROCOURT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. /In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. p. 337–351, 1997.
- ROUSSEAUX, S.; OLIER, M.; LEMAITRE, J. P.; PIVETEAU, P.; GUZZO, J. Use of PCR-Restriction fragment length polymorphism of *inlA* for rapid screening of *Listeria monocytogenes* strains deficient in the ability to invade Caco-2 cells. *Applied Environmental Microbiology*, v. 70, n. 4, p. 2180 - 2185, 2004.

- SASAHARA, K.; ZOTTOLA, E. A. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilize a primary colonizing microorganism in flowing systems. *Journal Food Protection*, v.56, p.1022–1028, 1993.
- SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachement of *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, ruber and polytetrafluorethylene: influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*. London, UK, v.17, p.439-447, 2000.
- STEPANOVIC, S.; CIRKOVIC, I.; RANIN, L.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, v.38, p. 428-432, 2004.
- STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, v.40, p.175–179, 2000.
- VASUDEVAN, N. M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN. Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology*, v.92, p.179-185, 2003.
- WILKS, S. A.; MICHELS, H. T.; KEEVIL, C. W. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: Implications for cross-contamination. *Internacional Journal of food Microbiology*, v.111, p.93-98, 2006.

CAPÍTULO 2

Este trabalho deu origem ao artigo “Evaluation of the effectiveness of chlorinated alkaline sanitizers against *Listeria monocytogenes*.” que foi submetido para publicação na revista Higiene Alimentar.

**EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF CLORINATED ALKALINE
SANITIZERS AGAINST *Listeria monocytogenes*.**

Bonsaglia, E.C. R.^a, Fernandes Júnior, A.^a, Tsunemi, M. H.^b, Rall, V.L.M.^{a*}

a

Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, Sao Paulo, State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

b

Department of Biostatistics, Institute of Biosciences, Sao Paulo, State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

*Corresponding author:

Vera Lucia Mores Rall

Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, UNESP- University Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Botucatu, São Paulo, Brazil.

Caixa Postal 510 CEP:18618-000, Distrito de Rubião Junior., s/n.

Tel. (+5514) 3811-6240, Fax (+5514) 3811-6240

Email: vlmores@ibb.unesp.br

RESUMO

Avaliação da eficácia de sanitizantes alcalino clorado frente à *Listeria monocytogenes*.

Listeria monocytogenes é uma crescente preocupação para indústria devido a sua capacidade de crescer em temperatura de refrigeração durante o armazenamento de alimentos. Falhas na erradicação dessa bactéria pode resultar em grandes perdas econômicas e sérios problemas na saúde pública. Este trabalho teve por objetivo analisar 32 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de diferentes alimentos frente a dois sanitizantes alcalino clorado em diferentes concentrações e tempos de exposição. Os resultados mostraram que o produto A, na concentração recomendada pelo fabricante, eliminou 46,8% das cepas no tempo mediano de 30'. Já o produto B, eliminou 50% das cepas no tempo mediano de 15'. Concluímos que apesar de estar em suspensão à bactéria mostrou certa resistência ao produto alcalino clorado e o tempo de exposição representa um fator determinante para eficácia do produto.

Palavras chaves: *L. monocytogenes*, sanitizantes, concentrações, tempo de exposição.

ABSTRACT

Evaluation efficacy of chlorinated alkaline sanitizers against *Listeria monocytogenes*.

Listeria monocytogenes is a growing concern for the industry due to its ability to grow at refrigeration temperature for food storage. Failures in the eradication of this bacterium can result in large economic losses and serious problems in public health. This study aimed to analyze 32 strains of *L. monocytogenes* isolated from different foods in front of two chlorinated alkaline sanitizers at different concentrations and exposure times. The results showed that the product A at the concentration recommended by the manufacturer, removed 46.8% of the strains in the median time of 30 '. Have the product B, eliminated 50% of the strains at the median of 15 '. We conclude that despite being in the suspended bacteria showed some resistance to the chlorinated alkaline product and exposure time is the determining factor for product effectiveness.

Key words: *L. monocytogenes*, sanitizers, concentrations, exposure time.

1. INTRODUÇÃO

A resistência de *Listeria monocytogenes* à maioria dos desinfetantes químicos sob condições específicas destaca a importância do desenvolvimento de novas abordagens de desinfecção e mais agentes de desinfecção eficientes (FRANK & KOFFI, 1989). Uma vez que concentrações mais elevadas de desinfetantes seriam necessárias para superar a resistência de *L. monocytogenes*, isso aumentaria a sua carga sobre o meio ambiente, constituindo perigo para a saúde dos funcionários. (ROY et al., 1993).

A atividade antimicrobiana dos desinfetantes pode ser influenciada por vários fatores, como sua composição química, a concentração, o tempo de contato, a presença ou ausência de matéria orgânica, a temperatura e o pH (MCDONNELL & RUSSELL, 1999; WIRTANEN & SALO, 2003; MEYER, 2006). O uso inadequado dos desinfetantes em relação ao tempo, concentração e temperatura pode levar a exposição regular dos contaminantes causando o surgimento de cepas persistentes que são difícil de erradicar (MCDONNELL & RUSSELL, 1999) contribuindo para o desenvolvimento de biofilmes, os quais podem conter micro-organismos patogênicos (BOS et al., 2000).

O processo de higienização é mais eficiente quanto maior for o tempo de contato entre agente sanitizante e superfície, porém as reações ocorrem mais eficazmente nos minutos iniciais da aplicação dos agentes químicos (ANDRADE & MACEDO, 1996).

Nenhum composto sanitizante apresenta todas as características ideais para destruir todos os micro-organismos presentes no ambiente. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de analisar a eficácia de diferentes concentrações de sanitizantes alcalino clorado frente a cepas de *Listeria monocytogenes*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras:

Foram utilizadas 30 cepas previamente identificadas, isoladas de leite, vegetais e ambiente de processamento, cedidas pelos laboratórios de Microbiologia de Alimentos da UNESP/ Botucatu e pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Além de 2 cepas padrão ATCC 7644 e 16313.

2.2 Confirmação da espécie:

Foi pesquisado o gene *inlA* específico para *L. monocytogenes*, pela técnica da PCR (*Polimerase Chain Reaction*).

2.3. Análise por PCR do gene *inlA*

2.3.1 Extração e Purificação de DNA

Cada cepa de listeria foi inoculada em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) a 37°C/24 h e 300 µL foi transferido para tubos de microcentrífuga, submetido à extração e purificação do DNA, empregando-se o kit comercial “MiniSpin” (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante.

O tubo foi centrifugado a 13.000 rpm / 30 seg (Eppendorf 5415R), o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 40 µl de tampão de lisozima e 10 µL de lisozima, o tubo foi homogeneizado e mantido em temperatura ambiente por 15 minutos, com homogeneização ocasional. A seguir, foram adicionados 10 µL de proteinase K e homogeneizado. Após essa etapa, foram adicionados 500 µL de solução de extração, homogeneizado e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Todo volume foi transferido para uma coluna e centrifugado a 8.000 rpm/1 minuto. O volume filtrado foi descartado e novamente foram adicionados 500 µL de solução de extração na coluna que foi centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto, descartando-se o volume filtrado. Em seguida, foram adicionados 500 µL de solução de lavagem e centrifugado a 12.000 rpm por 3 minutos, com descarte do filtrado. A coluna foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, com adição de 200 µL de solução de eluição (água Milli Q autoclavada e previamente aquecida a 56°C em banho-maria), incubado à temperatura ambiente por 1 minutos e centrifugado a 8.000 rpm durante 1 minuto. A amostra foi congelada a - 20°C até o momento do uso para a reação em cadeia pela polimerase (PCR).

2.3.2 Amplificação do ácido nucléico (PCR)

O volume de 25 µL foi composto por 2,5 µL de PCR Buffer 10x (Invitrogen), 0,75 µM de Cloreto de Magnésio (Invitrogen), 200 µl de cada dNTP , 1 U de Taq DNA Polimerase, 10 picomoles de cada primer (Quadro 1), água ultrapura autoclavada (qsp) (Milli-Q Plus, Millipore) e 3 µL da amostra de DNA. A incubação foi realizada em Gene Amp PCR System 9700 (AppliedBiosystem) empregando-se os parâmetros de um ciclo inicial a 94°C durante 5 minutos para desnaturação inicial, seguidos por 35 ciclos com 94°C/30s, 60°C/30s e 72°C/30s. A temperatura de extensão final foi de 72°C por 4 minutos. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água ultrapura. Como controle positivo, foram utilizadas duas cepas padrão de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e ATCC 16313 (ARNOLD et al., 2004).

Quadro 1: Oligonucleotídeos e suas propriedades utilizados na confirmação da espécie *L. monocytogenes*.

Sequência		T°C	Pb
		anelamento	
<i>inlA</i>	AATCTAGCACCCTGTCTGGG		
	TGTGACCTTCTTTTACGGGC	50	733

Pb: pares de bases; T°C: temperatura em graus centígrados

2.4. Visualização dos produtos amplificados

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese (Electrophoresis Power Supply Model EPD 600 – Amersham-Pharmacia Biotech Inc.®) em gel de agarose 1,5% em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com SYBR Green (2µl 10x/0,8µL de amostra - Invitrogen®). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA de 50 ou 100 pb, sendo analisados e fotografados em analisador de imagens (AlphaImager – Alpha esasy FC Software – AlphaInotech Corporation®).

2.5. Preparo das diluições com os sanitizantes

Foram testados 2 sanitizantes, a base de alcalino clorado, em cinco diluições diferentes, incluindo a recomendada pelo fabricante, em cinco tempos de contato.

Para o produto A as diluições utilizadas foram 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 e para o produto B as diluições utilizadas foram: 1/200, 1/300, 1/400, 1/500 e 1/600. (PELCZAR et al., 1996, modificado).

2.6. Preparo das culturas

As cepas de *Listeria monocytogenes* foram semeadas em tubos com caldo com BHI e incubadas por 35°C/24h. Após 24hrs de incubação, cada cultura foi diluída em solução salina ajustada à escala 0,5 McFarland. De cada diluição transferiu-se 0,1 ml para cada tubo com as diluições escolhidas dos sanitizantes, homogeneizado e cronometrado o tempo de exposição a partir do tempo exato da adição da cultura ao sanitizante.

Após os tempos de 0', 5', 10', 15', 20' e 30' minutos de exposição, com auxílio de uma alça foram semeados em placas de TSA/YE. As placas foram incubadas a 35°C por 24horas. Após a incubação procedeu-se a leitura das placas.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados obtidos foi aplicado o teste de Friedman.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 PCR do gene *inlA*.

Todas as amostras previamente identificadas como *Listeria monocytogenes* foram confirmadas, através da técnica de PCR, com a pesquisa do gene *inlA* (Figura 1)

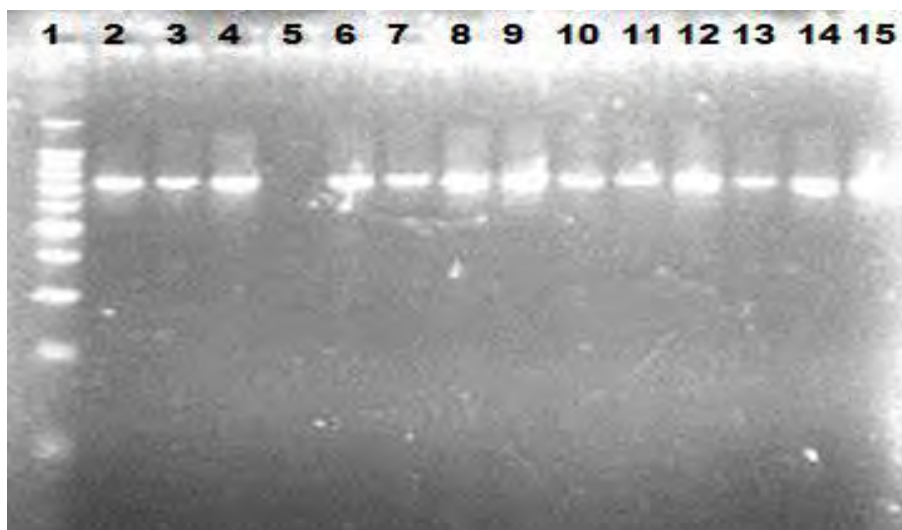


Figura 1: Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *inlA*. Poço 1: marcador de 100 pb; poços 2 e 3: *L. monocytogenes* ATCC 7644 e 16313; 4: cepa positiva; 5: controle negativo; 6 ao 15: amostras positivas.

4.2. Análise do tempo de exposição

Na comparação dos tempos e dos níveis de diluição para determinar o tempo necessário de exposição dos produtos para inibição do crescimento bacteriano, observou-se uma diferença no tempo mediano entre os níveis de diluição dos 2 sanitizantes (Tabela 1).

Tabela 1: Estatística descritiva do tempo de exposição por produto e diluição das 32 cepas de *L. monocytogenes*, frente aos sanitizantes alcalino clorado.

	Sanitizante alcalino clorado A					Sanitizante alcalino clorado B				
	1/10	1/25*	1/50	1/100	1/200	1/200	1/300*	1/400	1/500	1/600
Mínimo	5,0	10,0	10,0	20,0	30,0	5,0	5,0	10,0	15,0	20,0
Média	17,3	23,4	27,0	28,8	30,0	12,7	18,4	21,9	26,3	29,1
Mediana	15,0	<u>30,0</u>	30,0	30,0	30,0	10,0	<u>15,0</u>	20,0	30,0	30,0
Desv.Pad	8,5	7,5	5,9	5,9	0,0	6,0	7,2	6,9	5,4	3,0
Máximo	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0

*Diluição recomendada pelo fabricante.

Como esperado os produtos A e B apresentaram um melhor tempo mediano na diluição 1 quando comparado às outras diluições. Porém para a diluição recomendada pelo fabricante no Produto A o tempo mediano de exposição do produto foi de 30 minutos e das 32 cepas testadas, 15 (46,9%) morreram e para o Produto B o tempo mediano de exposição foi de 15 minutos eliminando 50% das cepas testadas. Best et al. (1990) testaram 14 desinfetantes, incluindo alcalinos clorados, frente a cepas de *L. monocytogenes* e relataram que todos foram eficazes em testes de suspensão, com redução de $> 5 \log_{10}$ UFC/ml.

É interessante ressaltar que, na embalagem de ambos os sanitizantes, havia recomendações sobre a diluição adequada, mas não em relação ao tempo ideal. Assim, corre-se o risco de exposição por tempo inadequado, impossibilitando uma desinfecção realmente efetiva. Deve ser ressaltado que o tempo de 30 minutos que matou ao menos metade das bactérias na concentração recomendada no Sanitizante A é bem longo.

Em muitos casos, *L. monocytogenes* pode contaminar lugares de difícil acesso aos desinfetantes em plantas de processamento de alimentos. Em tais condições é possível que a resistência do organismo para esses agentes aumente através de respostas adaptativas, como a produção de biofilmes (LUNDEN et al, 2003).

5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que *L. monocytogenes* pode apresentar variabilidade quanto a sua resistência aos compostos clorados e que esses produtos podem auxiliar no controle ou na diminuição dessas bactérias durante os processos de higienização dos equipamentos. Contudo, deve se levar em consideração que os testes foram realizados em bactérias em suspensão podendo sua resistência ao produto ser maior quando estas se encontram na forma de biofilme.

6. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, N. J.; MACEDO, J.A.B. Higienização na indústria de Alimentos. São Paulo: Varela, 182p., 1996.
- ARNOLD, T.; SCHOLZL, H. C.; MARG, H.; ROSLER, U.; HENSEL, A. Impact of invA-PCR and Culture Detection Methods on Occurrence and Survival of *Salmonella* in the Flesh, Internal Organs and Lymphoid Tissues of Experimentally Infected Pigs. *Journal of Veterinary Medicine B*, v. 51, n.10, p. 459-463, 2004.
- BEST, M.; KENNEDY, M. E.; COATES, F. Efficacy of a variety of disinfectants against *Listeria* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, n.2 p. 377-380, 1990.
- BOS, R.; VAN DER MEI, H.C.; GOLD, J.; BUSSCHER, H.J. Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. *FEMS Microbiology Review*., v.189, p.311-315, 2000.
- FRANK, F. J.; KOFFI, A. R. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal Food Protection*, v.53, p.550-554, 1989.
- LUNDEN, J., AUTIO, T., MARKKULA, A., HELLSTROM, S., KORKEALA, H. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, v.82, n.3, p.265–272, 2003
- MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, p.147–179, 1999.
- MEYER, B. Does microbial resistance to biocides create a hazard to food hygiene? *International Journal of Food Microbiology*, 112, 275–279, 2006.
- PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron books, 1996.
- ROY, B.; ACKERMANN, H. W.; PANDIAN, S.; PICARD, G.; GOULET, J. Biological Inactivation of Adhering *Listeria monocytogenes* by Listeriaphages and a Quaternary Ammonium Compound. *Applied Environmental Microbiology*, v. 59, n. 9, p. 2914-2917, 1993.
- WIRTANEN, G.; SALO, S. Disinfection in food processing – Efficacy testing disinfectants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v.2, p.293– 306, 2003.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARNISALO, K.; SALO, S.; MIETTINEN, H.; SUIHKO, M. L.; WIRTANEN, G.; AUTIO, T. Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. **Journal of Food Safety**, v.20, p.237–250, 2000.
- ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, J. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**. v. 61, n. 7, p.833-838, 1998.
- ANDRADE, N. J.; MACEDO, J. A. B. Higienização na indústria de alimentos. São Paulo: Varela, p.182, 1996.
- ARAÚJO, P.C.C. *Listeria monocytogenes*: Ocorrência, verificação da eficiência de dois meios de plaqueamento, sorovares predominantes e sensibilidade aos antimicrobianos de cepas isoladas em produtos de carne de peru comercializados na cidade de Niterói-RJ-Brasil. Niterói, RJ. 90 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Fluminense, UFF. Niterói, RJ, 1998.
- BELVAL, S. C.; GAL, L.; MARGIEWES, S.; GARMYN, D.; PIVETEAU, P.; GUZZO, J. Assessment of the roles of *luxS*, S-ribosyl homocysteine, and autoinducer 2 in cell attachment during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e. **Applied Environmental Microbiology**, v.72, p.2644-2650, 2006.
- BERSOT, L. A importância de *Listeria monocytogenes* para a saúde pública. In: I Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária. Curitiba. Anais. p.1-4, 2002.
- BERSOT, L.S.; LANDGRAF, M.; FRANCO, D.D.G.; DESTRO, M.T. Production of mortadella: behavior of *L. monocytogenes* during processing and storage conditions. **Meat Science**. v. 57, p.19-26, 2001
- BREMER, P. J.; FILLERY, S.; MCQUILLAN, A. J. Laboratory Scale Clean-In Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.254-262, 2006.
- CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene and the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**, n.75, p.499-511, 1993.
- CABEÇA, T. K. Suscetibilidade de microrganismos relacionados com a contaminação de alimentos em biofilme artificial e em suspensão frente a desinfetantes. 105 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2006.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., Coliformes totais e Fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba(Brasil), **Ciência e Tecnologia de Alimentos.**, Campinas, v.21, p. 281-287, 2001.

CHIARINI, E. *Listeria monocytogenes* em matadouro de aves: marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor junto a Faculdade de Ciencias Farmaceuticas da USP. 149p., São Paulo,2007.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Institute of Food Science and Technology**, v.2, p.22-32, 2003.

CONTRERAS, C. J.; BROMBERG, R.; CIPOLLI, K. M. V. A. B.; MIYAGUSKU, L. Higiene e sanitização na indústria de carne e derivados. São Paulo: Varela, 181p., 2003.

COSTERTON, J.W. Introduction to biofilm. **Internacional Journal Antimicrobial Agents**, v.11, p.217-221, 1999.

CUMMINS, A.J., FIELDING, A.K. McLAUCHLIN, J. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. **Journal of Infection**. v.28, p. 89 -91, 1994.

DONLAN, M. R.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.2, p. 167–193, 2002.

DORSA, W. J.; MARCHAL, D. L.; MOODY, M. W.; HACKNEY, C. R. Low temperature growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in precooked crawfish tail meat. **Journal of Food Protection**, v. 56, p.106-109, 1993.

DOYLE, M. P.; SCOENI, J. L. Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. **Food Tecnology** v. 42, n.4, p.169-171, 1988.

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiology** v.61, p.3872–3874, 1991.

FAST FACTS. Listeriosis. Center for Food Security & Public Health. IOWA STATE UNIVERSITY, 2006.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Ateneu, p. 34. 1996.

GAMBLE, R.; MURIANA, P. M. A microplate fluorescence assay for the measurement of the ability of strains of *Listeria monocytogenes* from meat and meat processing plants to adhere to abiotic surfaces. **Applied Environment Microbiology**. v.73, p.5235–5244, 2007.

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, 2007.

GIBSON, H.; TAYLOR, J.H.; HALL, K.E.; HOLAH, J.T. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal Applied Microbiology**, v.87, p.41-48, 1999.

GRAM, L., BAGGE-RAVN, D., Ng, Y. Y.; GYMOESE, P.; VOGEL, B. F. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.18, p.1165–1171, 2007.

GRAVES, L. M., HELSEL, L.O., STEIGERWALT, A.G., MOREY, R.E., DANESHVAR, M. I., ROOF, S. E., ORSI, R. H., FORTES, E. D., MILILLO, S.R., DEN BAKKER, H. C., WIEDMANN, M., SWAMINATHAN, B., SAUDERS, B.D. *Listeria marthii* sp., isolated from the natural environment. Finger Lakes National Forest. **International Journal Systematic and Evolucionary Microbiology**, v.60, p.1280–1288, 2010.

GRAY, M. J.; ZADOKS, R. N.; FORTES, E. D.; DOGAN, B.; CAI, S.; CHEN, Y.; SCOTT, V. N.; GOMBAS, D.E.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* isolates from food and humans form distinct but overlapping populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p. 5833 - 5841, 2004.

HAMDI, T. M.; NAIM, M.; MARIM, P.; JACQUET, C. Identification and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated in raw milk in the region of Algiers (Algéria). **International Journal of Food Microbiology**. v.116, n.1, p.190-193, 2007.

HARDIE, K. R.; HEURLIER, K. Establishing bacterial communities by ‘word of mouth’: *luxS* and autoinducer 2 in biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, p.635-643, 2008.

HAYES, P. R. Microbiología e higiene de los alimentos. Zaragoza: Acribia, p.187- 196, 1993.

HOFER, E.; REIS, C.M.F. Species and serovars of *Listeria* isolated from sick and clinically healthy animals in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 79-83, 2005.

HOFER, C. B.; MELLES, C. E. A.; Hofer, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 41, n.6, 1999.

HOFER, E.; NASCIMENTO, R. S.; Oliveira, M. A. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.2, p.173-177, 1998.

HOFFMANN, F. L.; COELHO, A. R.; MANSOR, A. P.; VINTURIM, T. M. Avaliação da atividade antimicrobiana "in vitro" de dois agentes sanificantes de uso industrial. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 94, p. 62-67, 2002.

HUSS, H. H. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. Roma, Itália: FAO, 134p., 1997.

LECLERCQ, A., CLERMONT, D., BIZET, C., GRIMONT, P.A., LE FLECHE-MATEOS, A., ROCHE, S.M., BUCHRIESER, C., CADET-DANIEL, V., LE MONNIER, A., LECUIT, M., ALLERBERGER, F. *Listeria rocourtiae* sp. **International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology**, 2009.

LEMON, K. P, HIGGINS, D. E, KOLTER, R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v.189, p.4418-4424, 2007.

LONG, F.; ZHU, X.; ZHANG, Z.; SHI, X. Development of a Quantitative Polymerase Chain Reaction Method Using a Live Bacterium as Internal Control for the Detection of *Listeria monocytogenes*. **Diagnostic Microbiology and Infections Disease**. v.12, p.1-8, 2008.

LUNDE´N, J. M.; MIETTINEN, M. K.; AUTIO, T. J.; KORKEALA H. J. Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. **Journal of Food Protection**. v.63, p.1204–1207, 2000.

MAFU, A. A.; ROY, D.; GOULET, J.; MAGNY, P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. **Journal of Food Protection** v.53, p.742–746, 1990.

MARQUES, C. S. Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, 2005.

MITTELMAN, M. W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **Journal of Dairy Science**, v.81, p. 2760–2764, 1998.

MURRAY, E. G. D.; WEBB, R. E.; SWANN, M. B. R. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. **Journal Pathology Bacteriology**, v.29, p.407-439, 1926.

MOLTZ, A. G, MARTIN, S.E. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. **Journal of Food Protection** v.68, p.92–97, 2005.

NADON, C. A.; WOODWARD, D. L.; YOUNG, C.; RODGERS, F. G.; WIDMANN, M. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2704 – 2707, 2001.

NORTON, M. D; SCARLETT, J. M; HORTON, K.; SUE, D.; THIMOTHE, J.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. Characterization and pathogenic potencial of *Listeria monocytogenes* isolates from the smoked fish industry. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.646 – 653, 2001.

- PAN, Y.; BREIDT, F.; KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. **Applied and Environmental Microbiology** v.72, p. 7711–7717, 2006.
- PARIZZI, S. Q. F. Adesão Bacteriana em superfície de serviços de alimentação hospitalar avaliada pela microscopia de epifluorescência. Viçosa, MG: UFV. 57p. Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia de alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. Clinical Veterinary Microbiology. Philadelphia: Mosby, 1994.
- RIBEIRO, L. A. O.; RODRIGUES, N. C.; FALLAVENA, L. C. B.; OLIVEIRA, S. J.; Brito, M. A. Listeriose em rebanho de ovinos leiteiros na região serrana do Rio Grande do Sul: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, 316-319, 2006.
- ROCCOURT, J. Risk factors for listeriosis. **Food Control**. p.195-202, 1996.
- RONNER, A.; WONG, A. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-N rubber. **Journal of Food Protection**, v.56, p.750-758, 1993.
- SALAMANO, R.; BRASELLI, A.; HOPPE, A.; MONTEGHIRFO, R.; Silva, T. Neurolisteriosis in adults: report of six clinical cases. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**. São Paulo, v. 63, n.4, p. 1063-1069, 2005.
- SAMADPOUR, M. et al. Incidence of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in retail fresh ground beef, sprouts, and mushrooms. **Journal of Food Protection**. v. 69, n. 2, p. 441-443, 2006.
- SASAHARA, K.; ZOTTOLA, E. A. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilize a primary colonizing microorganism in flowing systems. **Journal of Food Protection**, v.56, p.1022–1028, 1993.
- SELA, S.; FRANK, S.; BELAUSOV, E.; PINTO, R. A Mutation in the *luxS* gene influences *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied Environmental Microbiology**, v.72, p.5653-5658, 2006.
- SILVA, W. P.; LIMA, A. S.; GANDRA, E. A.; ARAÚJO, M. R.; MACEDO, R. P.; DUVALL, E. H. *Listeria* spp. No processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Br. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, 2004.
- SEELINGER, H. P. R., JONES, D. *Listeria*. In: Sneath, H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G. (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 2, p.1235–1245, 1986.

SCHLECH, W. F. Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, v. 42, p.176–178, 1988.

SOMERS, E. B.; WONG, A. C. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. **Journal of Food Protection**, v.67, n.10, p.2218-29, 2004.

STOODLEY, P.; CARGO, R.; RUPP, C.J.; WILSON, S.; KLAPPER, I. Biofilm mechanics and shear induced deformation and detachment. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.36-38, 2002.

STOODLEY, P.; WILSON, S.; HALL-STOODLEY, L.; BOYLE, J.D.; H.M. LAPPIN-SCOTT, H.M.; COSTERTON, J.W. Growth and Detachment of Cell Clusters from Mature Mixed Species Biofilms. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, p. 5608-5613, 2001.

TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. Songklanakarin **Journal Science and Technology**, v.25, p.807-815, 2003.

TODHANAKASEM, T.; YOUNG G. M: Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms. **Journal of Bacteriology**, v.190, p.6030-6034, 2008.

TOYOSHIMA, M. T. K., APANAVICIUS, A.; SOEIRO, A. M. *Listeria monocytogenes* peritonitis in cirrhotic patients: first description in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 5, p. 291-293, 2006.

VASQUEZ – BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, B.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ- BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZALEZ – ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. **Clinical Microbiology Reviews**. v.14, n.3, p.584-640, 2001.

WADSWORTH, S. J., GOLDFINE, H. *Listeria monocytogenes* phospholipase C-dependent calcium signaling modulates bacterial entry into J774 macrophage-like cells. **Infection and Immunity**. v. 67, p.1770-1778, 1999.

WIEDMANN, M.; BRUCE, J. L.; KEATING, C.; JOHNSON, A. E.; McDONOUGH, P.L.; BATT, C. A. Ribotypes and virulence genes polymorphism suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in their pathogenic potencial. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 2707-2716, 1996.

WIRTANEN, G.; ALANKO, T.; MATILLA- SANDHOLM, T. Evaluation of epifluorescence image analysis of biofilm growth on stainless steel surfaces. v.5, n.6, p.319-326, 1996.

YOKOO, S.; PIZZOLITTO, A.C.; POZETTI, G.L.; PIZZOLITTO, E.L. Aderência e formação do biofilme por *Staphylococcus aureus* ao polietilenotereftalato (PET) usado como embalagem para acondicionamento de medicamento e cosméticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v. 25, p.37-39, 2004.