

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GIOVANA VERGINIA BARANCELLI

**Ocorrência e caracterização sorológica e genotípica de  
*Listeria monocytogenes* em indústrias de queijo do Estado de São Paulo**

---

Pirassununga  
2010

GIOVANA VERGINIA BARANCELLI

**Ocorrência e caracterização sorológica e genotípica de  
*Listeria monocytogenes* em indústrias de queijo do Estado de São Paulo**

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Zootecnia

Área de concentração: Qualidade e produtividade animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Ernani Porto

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da  
Universidade de São Paulo

B225o Barancelli, Giovana Verginia  
Ocorrência e caracterização sorológica e genotípica de *Listeria monocytogenes* em indústrias de queijo do Estado de São Paulo / Giovana Verginia Barancelli. -- Pirassununga, 2010.  
115 f.  
Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Alimentos.  
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.  
Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

1. *Listeria monocytogenes* 2. PFGE 3. Laticínio  
4. Queijo 5. Sorotipo. I. Título.

*Aos meus pais Renato (in memoriam) e Matilde, exemplos para a  
minha vida.*

*Ao Luís pelo carinho e compreensão.  
Ao meu filho João, pelos momentos que deixamos de ficar perto.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira pela orientação, confiança e ensinamentos.

Ao Dr. Ernani Porto pelo incentivo, idéias compartilhadas e apoio demonstrados na co-orientação deste trabalho.

Ao Dr. Ernesto Hofer pela atenção e apoio ao longo do trabalho. À equipe do laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ, especialmente à Cristhiane Falavina dos Reis.

À Dra. Juliana Pfrimer Falcão e a sua equipe de laboratório, especialmente ao Roberto, pelo suporte com o BioNumerics e importantes contribuições no início das análises com PFGE.

À Tarsila pelo auxílio nas coletas, amizade e companheirismo no decorrer da pesquisa.

Ao pessoal da UFRGS: Dr. Marcos José Pereira Gomes, pela concessão de microrganismos para testes preliminares. À Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso e equipe de laboratório, especialmente à Vanessa e Andreia, pela oportunidade de compartilharmos experiências na padronização de técnicas de análise.

Ao Dr. Luiz Carlos Basso e ao Dr. Cláudio Rosa Gallo, por disponibilizarem equipamentos.

À Dra. Monica Labate e à Dra. Cláudia Vitorello, pela atenção e esclarecimentos prestados.

À Denise, Roice e Rose, técnicas dos laboratórios, pela amizade e disponibilidade em ajudar.

Às estagiárias Laura e Natalia, pelas diversas ajudas e dedicação durante o experimento. À Livia, Maira e Alessandra, pela ajuda no período das coletas.

À Lucy, Sarah e Ademir, pelo apoio e companheirismo. Aos colegas Guilherme, Stela, Carol, Keliene, Cris, Milla, Bruna, Nicolle e Ligia pelo agradável convívio no laboratório.

Aos avós Iaro e Conceição pelos cuidados com o meu filho João.

Aos proprietários dos laticínios e suas equipes de colaboradores, por possibilitarem a realização dessa pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da pesquisa e pela bolsa de estudo.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos e à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade de realização deste trabalho.

A todos que, embora não nomeados individualmente, me apoiaram e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada

## RESUMO

BARANCELLI, G.V. **Ocorrência e caracterização sorológica e genotípica de *Listeria monocytogenes* em indústrias de queijo do Estado de São Paulo**. 2010. 115 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

Pesquisas sobre *Listeria monocytogenes* em indústrias de produtos lácteos no Brasil são escassas. Três laticínios (A, B e C) produtores de queijos do Estado de São Paulo foram monitorados para a presença de *L. monocytogenes* no período de outubro/2008 a setembro/2009. Foram realizadas 12 coletas, correspondentes a 12 lotes de queijo produzidos, sendo quatro de cada laticínio. Em cada laticínio, as visitas foram realizadas com intervalos de aproximadamente 2 meses entre cada uma. Foram analisadas 393 amostras, sendo 201 de superfícies com e sem contato com alimentos e 192 de alimentos (leite cru e pasteurizado e queijo) água e salmoura, para pesquisa de *L. monocytogenes*. As análises foram realizadas de acordo com o método do Food and Drug Administration (FDA). Os resultados confirmam a presença de *Listeria* spp nas instalações dos três laticínios. *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* foram as espécies isoladas neste estudo. Especificamente a espécie *L. monocytogenes* não foi encontrada no laticínio A, entretanto, o microrganismo foi isolado de 12,5% das amostras do laticínio B e de 9,1% do laticínio C. *L. monocytogenes* não foi isolada do leite cru dos silos, do leite pasteurizado, da água e dos queijos Minas frescal, nos 3 laticínios. Porém, no laticínio C, *L. monocytogenes* foi isolada de amostras de queijo Prato que foram incluídas apenas na 4ª coleta deste laticínio, além de ter sido isolada de amostras de salmoura. As maiores prevalências de contaminação por *L. monocytogenes* ocorreram em superfícies sem contato com alimentos, sendo positivas 51,6% das amostras do laticínio B e 21,7% do laticínio C. Em ambos os laticínios a bactéria também foi isolada de superfícies com contato com alimentos. Os resultados fornecem informações detalhadas dos pontos prioritários para o desenvolvimento de estratégias de controle de *L. monocytogenes* em laticínios e mostram a importância de programas de monitoramento ambiental do patógeno, mesmo em pequenas indústrias. Os 85 isolados identificados como *L. monocytogenes* revelaram-se de quatro sorotipos: 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b, com predomínio do 4b, em ambos os laticínios, o que é preocupante para a saúde pública. Com base nos resultados de PFGE (perfis combinados *Apal* e *Ascl*), 40 perfis (pulsotipos) foram obtidos. Pulsotipos foram isolados repetidamente entre coletas nos laticínios B e C, sugerindo persistência de linhagens nos laticínios. Apesar dos laticínios serem distantes e independentes, um pulsotipo foi compartilhado entre ambos. O laticínio A apresentou contaminação por mais de um pulsotipo de *L. seeligeri* e houve isolamento repetido de um pulsotipo dessa espécie, entre as coletas, sugerindo adaptação da bactéria e necessidade de controle do gênero *Listeria* nessa indústria. A ocorrência de um mesmo pulsotipo de *L. monocytogenes* com sorotipos diferentes (1/2b e 4b) mostra que a sorotipagem deve acompanhar análises mais refinadas como as de natureza genotípica.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, PFGE, laticínio, queijo, sorotipo.

## ABSTRACT






BARANCELLI, G.V. **Occurrence, serological and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* in cheese manufacturing plants in São Paulo State.** 2010. 115 f. Thesis (PhD) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

*Listeria monocytogenes* surveys in cheese manufacturing plants in Brazil are rare. Three cheese manufacturing plants (A, B and C) in São Paulo state were monitored for the presence of *Listeria monocytogenes* during the period of October/2008 – September/2009. Twelve samples surveys were taken corresponding to 12 cheese lots produced, four in each plant. In each cheese plant, the samples were taken at intervals of approximately 2 months. There were 393 samples analyzed, 201 from surfaces with and without contact with food and 192 of food (raw and pasteurized milk and cheese), water and brine, with the objective of searching for *L. monocytogenes*. The analyses were performed in accordance with Food and Drug Administration (FDA) method. The results confirmed the presence of *Listeria* spp in the facilities of three plants. *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* and *L. weschimeri* were the species isolated in this study. Specifically the *L. monocytogenes* specie was not isolated from plant A. However, the microorganism was isolated in 12.5% of the samples from plant B and 9.1% from plant C. *Listeria monocytogenes* was not isolated from raw milk in storage tanks, pasteurized milk, water or Minas frescal cheese samples from the three plants. Nevertheless, in plant C, *L. monocytogenes* was isolated in Prato cheese that was included only in the 4th sampling survey and also from the brine samples. The major prevalence of contamination by *L. monocytogenes* occurred on surfaces without contact with food, with 51.6% of the samples positive from plant B and 21.7% from plant C. In both plants, the microorganism was also isolated from food contact surfaces. The results provide detailed information about the critical points for the development of *L. monocytogenes* control strategies in cheese processing plants and, moreover, show the relevance of sampling programs of the pathogen, even in small cheese processing plants. The 85 isolates identified as *L. monocytogenes* were classified in four serotypes: 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b, with 4b dominating in both cheese plants, which is of concern to human health. On the basis of PFGE results (combined profiles *Apal* and *Ascl*), 40 profiles (pulsotypes) were found. Pulsotypes were isolated repeatedly among sampling surveys in plants B and C, suggesting persistence of lineages in the plants. Despite these plants being distant and independent, one pulsotype was shared between them. Plant A presented contamination by more than one pulsotype of *L. seeligeri* and there was a repetitive isolation of one pulsotype of this specie among samplings, suggesting adaptation of the bacterium and the need for control of the *Listeria* genus in this plant. The occurrence of one single pulsotype of *L. monocytogenes* with different serotypes (1/2b and 4b) show that serotyping should follow more refined analyses as the ones of genotypic nature.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, PFGE, cheese manufacturing plant, cheese, serotype.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do fluxograma básico do processamento do queijo Minas frescal nos 3 laticínios e do queijo Prato (Cobocó) no laticínio C.....	37
Figura 2 - (A) Exemplo de amostra que precisou de reisolamento: colônias típicas de <i>Listeria</i> no meio ALOA apresentando halo característico de <i>L. monocytogenes</i> com colônias contaminantes. (B) Colônias típicas de <i>Listeria</i> spp. no meio ALOA e (C) típicas de <i>Listeria</i> spp no meio Oxford, que não necessitaram reisolamento.....	53
Figura 3 – Reação de hemólise característica da espécie <i>L. monocytogenes</i> pelo Teste de CAMP .....	54
Figura 4 – Número e percentual de amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i> , de acordo com a classificação das áreas de maior (Zona 1) e menor (Zona 4) risco de contaminação para produtos alimentícios conforme ILSI (2005).....	59
Figura 5 – Formas de queijos e caixas plásticas (vazadas) sobre o piso no laticínio B .....	60
Figura 6 – Queijos do laticínio C armazenados em caixas plásticas vazadas .....	61
Figura 7 – Perfis de PFGE obtidos com a enzima <i>Apal</i> . L: Lambda Ladder PFGE Marker; 1b, 2b, 3b, 4b, 5b, 6b, 7b, 8b, 9b, 10b, 11b, 12b: isolados de <i>L. monocytogenes</i> digeridos com <i>Apal</i> .....	73
Figura 8 – Perfis de PFGE obtidos com a enzima <i>Ascl</i> . L: Lambda Ladder PFGE Marker; 29B, 30B, 31B, 32B, 33B, 34B, 35B, 36B, 37B, 38B, 39B, 40B: isolados de <i>L. monocytogenes</i> digeridos com <i>Ascl</i> .....	74
Figura 9 – Dendrograma representando relações genéticas (perfis de PFGE <i>Apal</i> e <i>Ascl</i> ) entre isolados de <i>L. monocytogenes</i> dos laticínios e isolados incluídos na análise: <i>L. monocytogenes</i> ATCC® 7644, <i>L. monocytogenes</i> EP97, <i>L. monocytogenes</i> EP10 e <i>L. seeligeri</i> . Os códigos de isolados, sorotipos, pontos de isolamento (fonte), ordem de coleta e pulsotipos estão apresentados à direita. Os sorotipos estão representados por cores:  4b;  1/2b;  1/2a;  1/2c. /  representam isolados de <i>L. seeligeri</i> .....	76

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Diferenciação bioquímica das espécies do gênero <i>Listeria</i> .....	16
Quadro 2 – Pontos de isolamento de <i>Listeria</i> spp. no laticínio A nas 4 coletas.....	50
Quadro 3 – Pontos de isolamento de <i>Listeria</i> spp. no laticínio B nas 4 coletas.....	51
Quadro 4 – Pontos de isolamento de <i>Listeria</i> spp. no laticínio C nas 4 coletas.....	52

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

