



Instituto Politécnico  
de Castelo Branco  
Escola Superior  
Agrária

instituto **Nacional de Saúde**  
Doutor Ricardo Jorge



# Estudo das vias de contaminação de *Listeria monocytogenes* numa queijaria

## PFGE, serotipagem, WGS e resistência a desinfetantes

Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar

Ana Rita Simões Ferraz

### **Orientadores**

Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Carla Maria Heliodoro Maia

Relatório de estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco e ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, Professora Adjunta da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco e da Mestre Carla Maria Heliodoro Maia Técnica Superior do Laboratório de Microbiologia, Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P.-Lisboa

Junho 2017



## Composição do júri

### Presidente do júri

Doutor, Celestino António Morais de Almeida,  
Professor Coordenador da Escola Superior Agrária de Castelo Branco

### Vogais

#### Orientadores:

Doutora, Cristina Maria Baptista Santos Pintado,  
Professora Adjunta da Escola Superior Agrária de Castelo Branco.  
Mestre, Carla Maria Heliodoro Maia,  
Técnica Superior no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

#### Arguentes:

Doutor, João Pedro Martins da Luz,  
Professor Coordenador da Escola Superior Agrária de Castelo Branco.  
Doutor, Manuel Vicente de Freitas Martins,  
Professor Coordenador da Escola Superior Agrária de Castelo Branco.



## **Dedicatória**

Eu, Ana Rita Simões Ferraz dedico o presente trabalho aos meus pais por todo o trabalho, dedicação, carinho e amor com que me educaram e fizeram de mim a pessoa que sou hoje. Em especial à minha mãe, por ser a enorme Mulher que é, que me faz crescer e lutar pelos meus sonhos. Ao meu pai, pelo Homem que é e pelo apoio que me tem dado. Agradeço aos meus irmãos, por toda a boa disposição e força que de alguma forma me dão para fazer mais e melhor, tanto não seja para lhes dar o exemplo, sendo eu a irmã mais velha, compete-me esse feito.

Dedico este trabalho ao meu namorado porque sem ele nada disto era possível. Toda a força, garra e coragem para fazer este trabalho foi graças a ele estar ao meu lado e dar-me todo esse enorme apoio. A palavra certa no momento certo, o estímulo para trabalhar e fazer cada vez mais e melhor.



## Agradecimentos

Agradeço do fundo do meu coração à Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado por todo o apoio e dedicação que teve para comigo, pois sem ela este trabalho não seria possível.

O meu obrigado à Doutora Antónia Calhau por ter autorizado a realização deste trabalho de estágio no Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge I.P.- Lisboa.

Gratifico a Engenheira Cristina Belo Correia pela oportunidade de realizar este estágio no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição. Agradeço a sua atenção, o seu carinho, apoio e preocupação que demonstrou ao longo do tempo de estágio.

Agracio a Engenheira Carla Maria Heliodoro Maia, Técnica Superior no Laboratório de Microbiologia, Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge I.P.-Lisboa, por todo o empenho e dedicação que teve para comigo de forma a tornar este trabalho possível.

Reconheço com muita gratidão o auxílio profissional e pessoal da Técnica Superior Maria João Barreira do Laboratório de Microbiologia, Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge I.P.-Lisboa.

Agradeço a todas as técnicas do Laboratório de Microbiologia, Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge I.P.-Lisboa, por me terem recebido de braços abertos e pelo apoio dentro e fora do laboratório. Agradeço então, à Anabela Coelho, Cristina Flores, Helena Marques, Rosália Furtado, Sílvia Marcos e Susana Santos.

Quero agradecer à Engenheira Manuela Goulão, técnica superior do Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, pelo apoio dado na realização da serotipagem por PCR.

Obrigado à queijaria, pela cedência das amostras, por ter permitido a visita às instalações da queijaria e a realização deste trabalho prático.

Agradeço também ao Instituto Pasteur de Paris pela colaboração na tipagem e sequenciação das amostras enviadas.

Um muito obrigado à minha mãe que sempre me deu força e coragem para seguir em frente e lutar por aquilo que quero. Ao meu namorado, agradeço toda a força, insistência, coragem e apoio que me deu durante este período de estágio.

Muito obrigado a todos os que me acompanharam e apoiaram nesta fase da minha vida.

Muito obrigado a todos.



## Resumo

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria ubiqüitária, disseminada pelo ambiente que pode causar uma doença rara mas grave denominada listeriose. A taxa de mortalidade desta doença em humanos é de 20-30%, sendo o queijo dos alimentos mais vezes implicado em casos esporádicos ou surtos de listeriose por todo mundo. A contaminação ambiental tem sido diversas vezes considerada como uma das principais fontes de contaminação de alimentos prontos para consumo, como é o caso do queijo.

O principal objetivo deste trabalho foi estudar as possíveis fontes de contaminação por *L. monocytogenes* de queijos fabricados com leite cru de ovelha produzidos numa queijaria do Sul de Portugal, com histórico de pesquisa positiva, no período de 2011 a 2016. Para isso realizou-se a tipagem por PFGE e serotipagem molecular de 77 isolados de *L. monocytogenes* e a um conjunto de oito isolados selecionados foi efetuada a tipagem por MLST e cgMLST. Avaliou-se ainda a atividade bactericida dos desinfetantes químicos utilizados na queijaria segundo a Norma EN 1040/2005. Com este estudo pretendeu-se contribuir para a resolução do problema de contaminação da queijaria por *L. monocytogenes*.

As culturas de *L. monocytogenes* (n =77) foram isoladas de queijos de ovelha curados (n=51), queijos de ovelha à saída da prensa (n=3), leite cru de ovelha (n=9), esfregaços de mãos (n=3) e esfregaços de superfícies (n=11). A tipagem molecular por PFGE resultou em 13 perfis *Ascl* e 10 perfis *Apal* sendo o pulsotipo *Ascl* 007/*Apal* 002 o mais representativo (n=32) dos isolados de *L. monocytogenes*. No total das 77 culturas, 95% pertenciam ao PCR serogrupo IIa (n=70) e 5% pertenciam ao PCR serogrupo IVb. Isolados de esfregaços de superfícies com pulsotipo *Ascl* 007/*Apal* 002 revelaram resistência ao desinfetante III (2-5%, 15 minutos). Todas as oito estirpes de *L. monocytogenes* selecionadas para sequenciação pertencem ao CC7 (MLST), ST7 (MLST), SL7(cgMLST) e à linhagem II (MLST). Relativamente ao tipo cgMLST obtiveram-se quatro perfis (CT2915, CT2916, CT2917 e CT2918), o que representa um melhor poder discriminatório relativamente aos dois perfis PFGE previamente identificados para estas oito estirpes. A tipagem molecular dos isolados de *L. monocytogenes* revelou que o leite cru de ovelha e o ambiente da queijaria são fontes importantes de contaminação e que algumas estirpes persistiram pelo menos durante dois anos no ambiente.

## Palavras chave

Queijo; Isolados; Similariedade; DNA; Persistência.



## Abstract

Study of the contamination pathways of *Listeria monocytogenes* in a cheese factory - PFGE, serotyping, WGS and resistance to disinfectants

*Listeria monocytogenes* is an ubiquitous, environment-borne bacterium that can cause a rare but serious disease called listeriosis. The mortality rate of this disease in humans is 20-30%, with food cheese being more often implicated in sporadic cases or outbreaks of listeriosis worldwide. Environmental contamination has several times been considered as one of the main sources of contamination of food ready for consumption, as is the case of cheese.

The main objective of this work was to study the possible sources of *L. monocytogenes* contamination of cheeses made from raw milk from sheep produced in a dairy from the south of Portugal, with positive research history, from 2011 to 2016. For this purpose, The PFGE typing and molecular serotyping of 77 *L. monocytogenes* isolates and a set of eight selected isolates were typed by MLST and cgMLST. It was also evaluated the bactericidal activity of the chemical disinfectants used in cheesemaking according to the Norm EN 1040/2005. The aim of this study was to contribute to the problem of contamination of cheese by *L. monocytogenes*.

Cultures of *L. monocytogenes* (n = 77) were isolated from cured sheep cheeses (n = 51), sheep cheeses exiting the press (n = 3), raw sheep milk (n = 9), hand smears (N = 3) and surface smears (n = 11). The molecular typing by PFGE resulted in 13 *AscI* profiles and 10 *ApaI* profiles being the most representative *AscI* 007 / *ApaI* 002 pulse (n = 32) of *L. monocytogenes* isolates. In all 77 cultures, 95% belonged to serogroup IIa PCR (n = 70) and 5% belonged to serogroup IVb PCR. Isolates from surface swabs with *AscI* 007 / *ApaI* 002 pulse showed resistance to disinfectant III (2-5%, 15 minutes). All eight strains of *L. monocytogenes* selected for sequencing belong to CC7 (MLST), ST7 (MLST), SL7 (cgMLST) and to lineage II (MLST). Regarding the cgMLST type, four profiles (CT2915, CT2916, CT2917 and CT2918) were obtained, which represents a better discriminatory power with respect to the two PFGE profiles previously identified for these eight strains. Molecular typing of *L. monocytogenes* isolates revealed that raw sheep's milk and the cottage industry are important sources of contamination and that some strains persisted for at least two years in the environment.

## Keywords

Cheese; Isolates; Similarity; DNA; Persistence.



# Índice geral

<b>ÍNDICE GERAL</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>2</b>
2.1. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> .....	2
2.1.1. <i>Aspetos históricos</i> .....	2
2.1.2. <i>Taxonomia</i> .....	3
2.1.3. <i>Espécies de Listeria</i> .....	4
2.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, CULTURAIS E BIOQUÍMICAS.....	7
2.2.1. <i>Morfologia</i> .....	7
2.2.2. <i>Características da cultura</i> .....	7
2.2.3. <i>Metabolismo e características bioquímicas</i> .....	8
2.3. ESTRUTURA ANTIGÉNICA .....	8
<b>3. LISTERIOSE</b> .....	<b>10</b>
3.1. FORMAS DE LISTERIOSE INVASIVA.....	11
3.2. FORMAS DE LISTERIOSE NÃO INVASIVA .....	12
3.3. DOSE MÍNIMA INFECIOSA E MECANISMOS DE INFEÇÃO.....	12
3.4. DIAGNÓSTICO .....	14
3.5. PROCEDIMENTO LEGAL .....	14
3.6. TRATAMENTO.....	15
3.7. PREVENÇÃO.....	15
3.8. EPIDEMIOLOGIA .....	16
<b>4. LISTERIA MONOCYTOGENES - DISSEMINAÇÃO AMBIENTAL</b> .....	<b>16</b>
4.1. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> NOS ANIMAIS .....	16
4.2. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> NOS ALIMENTOS.....	17
4.3. INCIDÊNCIA.....	19
4.3.1. <i>Incidência em Portugal</i> .....	19
4.3.2. <i>Prevalência nos alimentos</i> .....	20
<b>5. LISTERIA MONOCYTOGENES NA INDÚSTRIA QUEIJEIRA</b> .....	<b>23</b>
5.1. PRODUÇÃO DE QUEIJO.....	24
5.2. HACCP NA INDÚSTRIA QUEIJEIRA .....	28
5.3. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> EM QUEIJOS.....	28
<b>6. PERSISTÊNCIA DE LISTERIA MONOCYTOGENES NA INDÚSTRIA ALIMENTAR</b> .....	<b>29</b>
6.1. LIMPEZA.....	30
6.2. DESINFEÇÃO .....	32
6.2.1. <i>Eficácia dos desinfetantes contra Listeria monocytogenes</i> .....	33
6.2.2. <i>Atividade bactericida dos desinfetantes químicos</i> .....	33
<b>7. MÉTODOS LABORATORIAIS</b> .....	<b>34</b>

7.1. MÉTODOS CONVENCIONAIS .....	34
7.2. MÉTODOS RÁPIDOS.....	35
7.3. MÉTODOS DE TIPAGEM MOLECULAR.....	37
7.3.1. <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)</i> .....	37
7.3.2. <i>Serotipagem</i> .....	40
7.4. <i>WHOLE GENOME SEQUENCING (WGS)</i> .....	41
<b>8. INTRODUÇÃO AO TRABALHO LABORATORIAL.....</b>	<b>42</b>
<b>9. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
9.1. PESQUISA DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> EM SUPERFÍCIES .....	43
9.2. ISOLADOS BACTERIANOS .....	44
9.3 TIPAGEM POR PFGE .....	44
9.3.1. <i>Preparação das suspensões bacterianas</i> .....	46
9.3.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	46
9.3.1.2 <i>Salmonella</i> Braenderup H9812 .....	46
9.3.2. <i>Preparação dos discos de agarose</i> .....	46
9.3.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	46
9.3.2.2. <i>Salmonella</i> Braenderup H9812 .....	47
9.3.3. <i>Corte dos discos e lise celular</i> .....	47
9.3.4. <i>Lavagens</i> .....	47
9.3.5. <i>Digestão do DNA com enzimas de restrição</i> .....	48
9.3.5.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	48
9.3.5.2. <i>Salmonella</i> Braenderup H9812 .....	48
9.3.6. <i>Eletroforese de campo pulsado</i> .....	49
9.3.6.1. Preparação e carregamento do gel de agarose.....	49
9.3.6.2. Programação do equipamento de PFGE.....	49
9.3.7. <i>Coloração e revelação do gel</i> .....	50
9.3.8. <i>Tratamento dos dados da tipagem por PFGE</i> .....	51
9.4. SEROTIPAGEM POR PCR MULTIPLEX.....	51
9.4.1. <i>Culturas bacterianas</i> .....	51
9.4.2. <i>Extração de DNA</i> .....	52
9.4.3. <i>Amplificação do DNA por PCR Multiplex</i> .....	52
9.4.4. <i>Separação dos fragmentos de DNA por eletroforese convencional</i> .....	52
9.4.5. <i>Coloração e revelação do gel de agarose</i> .....	53
9.5. <i>WHOLE GENOME SEQUENCING (WGS)</i> .....	53
9.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DOS DESINFETANTES QUÍMICOS .....	53
9.6.1 <i>Princípio do teste</i> .....	53
9.6.2. <i>Culturas usadas no ensaio</i> .....	54
9.6.3. <i>Soluções dos desinfetantes em teste</i> .....	55
9.6.4. <i>Soluções dos neutralizantes testados</i> .....	55
9.6.5. <i>Condições experimentais</i> .....	56
9.6.6. <i>Suspensões teste “N”</i> .....	56
9.6.7. <i>Suspensão de validação “Nv”</i> .....	56

9.6.8. Controlo "A" (Validação das condições experimentais) .....	57
9.6.9. Controlo "B" (Verificação da ausência de toxicidade do neutralizante)....	57
9.6.10. Controlo "C" (Validação da diluição-neutralização).....	57
9.6.11. Teste "Na" (Determinação da concentração bactericida).....	58
9.6.12. Incubação e contagem.....	58
9.6.12.1. Determinação dos valores $V_c$ .....	58
9.6.12.2. Cálculo do $N$ e $N_0$ .....	59
9.6.12.3. Cálculo de $N_a$ .....	59
9.6.12.4. Cálculo de $N_v$ e $N_v0$ .....	59
9.6.12.5. Cálculo de $A$ , $B$ e $C$ .....	60
9.6.12.6. Cálculo da redução bacteriana "R" .....	60
<b>10. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
10.1. RESULTADOS DA PESQUISA DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> EM SUPERFÍCIES DA QUEIJARIA .....	61
10.2. PFGE.....	64
10.3. SEROTIPAGEM POR <i>PCR MULTIPLEX</i> .....	68
10.4. <i>WHOLE GENOME SEQUENCING (WGS)</i> .....	72
10.5. ATIVIDADE BACTERICIDA DOS DESINFETANTES QUÍMICOS .....	75
<b>11. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>95</b>
ANEXO I: RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DO DESINFETANTE I.....	96
ANEXO II: RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DO DETERGENTE/DESINFETANTE II.....	97
ANEXO III: RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DO DESINFETANTE III.....	98
ANEXO IV: RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DO DETERGENTE/DESINFETANTE IV .....	99



## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Mecanismo de infecção por <i>Listeria monocytogenes</i> . .....	13
<b>Figura 2:</b> Proporção de amostras individuais da indústria alimentar e distribuição não conformes com os critérios de segurança alimentar da EU para <i>Listeria monocytogenes</i> , 2011-2015. RTE: pronto a consumir. Entre parênteses, o número de Estados Membros (EM) que relataram dados sobre a categoria específica de alimentos em 2015 e o número total das unidades testadas (n).....	22
<b>Figura 3:</b> Fluxograma geral da produção de queijo.....	27
<b>Figura 4:</b> Círculo de Sinner, representando os fatores relevantes nas operações de limpeza. ....	30
<b>Figura 5:</b> Meios sólidos seletivos para <i>Listeria</i> . A: ALOA, B: Oxford, C: Hemólise, D: Coloração Gram.....	35
<b>Figura 6:</b> Funcionamento do sistema CHEF. ....	38
<b>Figura 7:</b> Representação e identificação do número de bandas e respetivo peso molecular obtidos para <i>Salmonella</i> Braenderup H9812 após digestão com a enzima <i>XbaI</i> .....	39
<b>Figura 8:</b> Equipamentos utilizados na técnica de tipagem por PFGE. A: Eletroforese cell, B: “CHEF Mapper”, C: Colling Module, D: Variable Speed Pump.....	50
<b>Figura 9:</b> Exemplo de fotografia de gel, obtida por PFGE. ....	51
<b>Figura 10:</b> Dendrograma (UPGMA cluster baseado no coeficiente de correlação) dos perfis PFGE de 77 culturas de <i>Listeria monocytogenes</i> , digeridas com <i>AscI</i> . O BioNumerics versão 3.5 foi utilizado com otimização de 1,0 % e tolerância 1,2 % para a comparação de bandas. Encontram-se indicados a referência dos isolados, bem como a origem, a data de isolamento, o perfil <i>AscI</i> , o perfil <i>Apal</i> e o serogrupo de cada cultura. a- Isolados com perfil <i>AscI</i> 003, b-Isolados com perfil <i>AscI</i> 007. ....	64
<b>Figura 11:</b> Dendrograma (UPGMA cluster baseado no coeficiente de correlação) dos perfis PFGE de 77 culturas de <i>Listeria monocytogenes</i> , digeridos com <i>Apal</i> . O BioNumerics versão 3.5 foi utilizado com otimização de 1,0 % e tolerância 1,2 % para a comparação de bandas. Encontram-se indicados a referência dos isolados, bem como a origem, a data de isolamento, o perfil <i>AscI</i> , o perfil <i>Apal</i> e o serogrupo de cada isolado. ....	66
<b>Figura 12:</b> Imagem obtida após amplificação e separação eletroforética dos genes marcadores e de 8 produtos <i>PCR Multiplex</i> de DNA isolados de queijo de ovelha curado (1 a 18) e leite cru de ovelha (19). As estirpes de <i>L. monocytogenes</i> A, B, C e D foram usadas como referência e correspondem, respetivamente, ao PCR serogrupo IIa (serotipos 1/2a, 3a), ao PCR serogrupo IVb (serotipos 4b, 4d, 4e), ao PCR serogrupo IIb (serotipos 1/2b, 3b, 7) e ao PCR serogrupo IIc (serotipos 1/2c, 3c).....	69
<b>Figura 13:</b> Análise baseada em cgMLST dos oito isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> . Árvores de abrangência mínima completa - GoeBURST (realizadas com PHYLOViZ) exibindo as relações genéticas dos 8 isolados de <i>Listeria</i>	

*monocytogenes*. As árvores são codificadas por cores de acordo com nomes de isolados (A), a linhagem filogenética (B), o PCR serpggrupo (C) e a linhagem (D). Cada círculo representa um clone (nomes de isolados mostrados no painel A) com um perfil cgMLST exclusivo.....73

**Figura 14:** Análise baseada em cgMLST dos oito isolados de *Listeria monocytogenes*. Árvores de abrangência mínima completa - GoeBURST (realizadas com PHYLOViZ) exibindo as relações genéticas dos 8 isolados de *Listeria monocytogenes*. As árvores são codificadas por cores de acordo com nomes de isolados (A), tipo cgMLST (B), ST's (MLST)(C) e complexo clonal (MLST) (D). Cada círculo representa um clone (nomes de isolados mostrados no painel A) com um perfil cgMLST exclusivo. Os números nas linhas de conexão no painel C representam distâncias alélicas entre clones. ....74

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Caracterização taxonômica de <i>Listeria</i> .....	4
<b>Tabela 2:</b> Espécies do gênero <i>Listeria</i> descritas ao longo dos anos. ....	6
<b>Tabela 3:</b> Serotipos de <i>Listeria</i> . ....	9
<b>Tabela 4:</b> Ocorrência de listeriose de 2011 a 2017 nos Estados Unidos da América. ..	23
<b>Tabela 5:</b> Categorias dos detergentes utilizados no processo de limpeza. ....	31
<b>Tabela 6:</b> Substâncias ativas biocidas dos desinfetantes comumente utilizados nas indústrias alimentares e os seus mecanismos de atuação.....	32
<b>Tabela 7:</b> Métodos rápidos para a pesquisa e identificação/confirmação de <i>Listeria monocytogenes</i> disponíveis no mercado.....	36
<b>Tabela 8:</b> Características das enzimas de restrição utilizadas.....	38
<b>Tabela 9:</b> Genes marcadores amplificados em cada PCR serogrupo de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	40
<b>Tabela 10:</b> Culturas de <i>Listeria monocytogenes</i> com perfil <i>AscI/ApaI</i> desconhecido. ..	45
<b>Tabela 11:</b> Componentes da solução de restrição para as enzimas <i>AscI</i> , <i>XbaI</i> e <i>ApaI</i> . .	48
<b>Tabela 12:</b> Características dos produtos (detergentes/desinfetantes) testados. ....	54
<b>Tabela 13:</b> Esquema da composição química dos neutralizantes testados. ....	55
<b>Tabela 14:</b> Resultados da pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> aos esfregaços efetuados à sala de recepção do leite e sala de produção da queijaria, em 2016. ....	61
<b>Tabela 15:</b> Resultados da pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> aos esfregaços efetuados nas câmaras de cura, na sala de lavagem do queijo, na sala de selagem e na sala de expedição da queijaria, em 2016.....	62
<b>Tabela 16:</b> Distribuição dos perfis <i>AscI</i> / <i>ApaI</i> das 77 culturas de <i>Listeria monocytogenes</i> tendo em conta o ano de isolamento (2011, 2012, 2013, 2014, 2015 e 2016), o tipo de amostra (Q-queijo, L-leite ou S-superfície) e o número de isolados com esse perfil (número a seguir ao ano).....	67
<b>Tabela 17:</b> Descrição cronológica dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> , a sua origem, os seus perfis <i>AscI</i> e <i>ApaI</i> , e o respetivo PCR serogrupo nos anos 2011-2014.....	69
<b>Tabela 18:</b> Descrição cronológica dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> , a sua origem, os seus perfis <i>AscI</i> e <i>ApaI</i> e o respetivo PCR serogrupo, no ano 2015. ....	70
<b>Tabela 19:</b> Descrição cronológica dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> , a sua origem, os seus perfis <i>AscI</i> e <i>ApaI</i> , e o respetivo PCR serogrupo, no ano 2016. ....	71
<b>Tabela 20:</b> Relação das três metodologias de tipagem molecular efetuadas a oito estirpes de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	72

**Tabela 21:** Número de isolados de *Listeria monocytogenes* que resistiram à atividade bactericida das concentrações teste dos desinfetantes I, II e III, após o tempo de contacto (5 e 15 minutos). ..... **76**

**Tabela 22:** Isolados de *Listeria monocytogenes* que apresentaram resistência “X” aos detergentes/desinfetantes testados e respetivo pcr serogrupo “X1”-resistência ao desinfetante I, “X2”-resistência ao detergente/desinfetante II, “X3”-resistência ao desinfetante III..... **76**

## Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

<b>ALOA</b>	<b>Agar <i>Listeria Ottavani &amp; Agosti</i></b>
<b>Apal</b>	Enzima de restrição clonada de <i>Acetobacter pasteurianus</i>
<b>Ascl</b>	Enzima de restrição clonada de <i>Streptomyces griseus</i> RFL5
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>aw</b>	Water activity
<b>BPF</b>	Boas Práticas de Fabrico
<b>BPH</b>	Boas Práticas de Higiene
<b>CC</b>	Complexo clonal
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention
<b>CEN</b>	Comité Européen de Normalisation
<b>cgMLST</b>	Core Genome Multilocus Sequence Typing
<b>CMB</b>	Concentração Mínima Bactericida
<b>CMI</b>	Concentração Mínima Inibitória
<b>CT</b>	Cluster Type
<b>D.O.</b>	Densidade Ótica
<b>DAN</b>	Departamento de Alimentação e Nutrição
<b>Dice</b>	Coefficiente ou índice de Sorensen-Dice
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid
<b>ECDC</b>	European Centre for Disease Prevention and Control
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority
<b>EN</b>	Norme Européenne
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FSIS</b>	Food Safety and Inspection Service
<b>HACCP</b>	Hazard Analysis and Critical Control Point
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus
<b>INSA</b>	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
<b>IP</b>	Instituição Pública
<b>ISO</b>	International Organization of Standardization
<b>min</b>	Minutos - unidade de medida do Sistema Internacional de Unidades para intervalos de tempo
<b>MLST</b>	Multilocus Sequence Typing
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio

<b>NCTC</b>	National Collection of Type Cultures
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PFGE</b>	Pulsed-field Gel Electrophoresis
<b>RNA</b>	Ribonucleic Acid
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>rRNA</b>	Ribonucleic Acid ribossomal
<b>RTE</b>	Pronto Para Consumo
<b>SINAVE</b>	Sistema Nacional de Informação de Vigilância Epidemiológica
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>ST</b>	Sequence Type
<b>TIFF</b>	Tagged Image File Format
<b>UE</b>	União Europeia
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colónia
<b>unit</b>	Unidade
<b>UPGMA</b>	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
<b>USDA</b>	United States Department of Agriculture
<b>UV</b>	Radiação Ultra Violeta
<b>WGS</b>	Whole Genome Sequencing
<b><i>Xba</i>I</b>	Enzima de restrição clonada de <i>Xanthomonas badrii</i>

## 1. Introdução

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria patogénica, Gram-positiva, que pode causar uma doença rara (listeriose) mas grave em indivíduos suscetíveis com uma taxa de mortalidade entre 20 a 30% (EFSA e ECDC, 2014). Esta bactéria tem sido isolada a partir de alimentos e do ambiente (Spanu *et al.*, 2015). O estudo de Almeida *et al.* (2013) relatou o isolamento de *L. monocytogenes* de diferentes superfícies de indústrias produtoras de queijo de ovelha. *L. monocytogenes* tem a particularidade de se adaptar a vários ambientes hostis, como é o caso dos queijos que apresentam pH ácido, encontram-se a temperaturas de refrigeração e apresentam alta salinidade (Yoon *et al.*, 2016). A contaminação de queijos com *L. monocytogenes* tem sido apontada como causa de vários surtos de listeriose em vários países (CDC, 2017b; Yoon *et al.*, 2016).

Para a investigação epidemiológica, é essencial conhecer o serotipo das estirpes de *L. monocytogenes* (Spanu *et al.*, 2015). O método tradicional de serotipagem por aglutinação permite classificar *L. monocytogenes* em 13 serotipos (Seeliger e Jones, 1986), enquanto um ensaio de *PCR Multiplex* discrimina os serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b (Doumith *et al.*, 2004). Como a maioria dos casos de listeriose humana está associada aos serotipos 1/2a, 1/2b e 4b, a utilidade do teste serológico convencional é questionada durante as investigações epidemiológicas (McLauchlin *et al.*, 2004). A investigação epidemiológica e o rastreio das vias de contaminação das indústrias produtoras de queijo devem associar duas técnicas de tipagem molecular tais como *Pulse Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e serotipagem por *PCR Multiplex* (Doijad *et al.*, 2015). PFGE foi considerado até há pouco tempo o método de tipagem *gold-standard* nas investigações epidemiológicas, podendo ser utilizado adequadamente na investigação da contaminação com *L. monocytogenes* em indústrias alimentares (Spanu *et al.*, 2015).

Atualmente, a evolução das tecnologias de sequenciação tem permitido a análise da sequência total do genoma. Vários estudos baseados na metodologia *Whole Genome Sequence* (WGS) para a tipagem de diversas espécies bacterianas, já demonstraram que esta metodologia, baseada no polimorfismo de nucleotídeo único (SNVs) (Turabelidze *et al.*, 2013; Eyre *et al.*, 2012) ou no *core genome Multilocus Sequence Typing* (cgMLST) (Mellmann *et al.*, 2011; Maiden *et al.*, 2013), representa atualmente a melhor abordagem para a tipagem molecular. Recentemente, foi aplicado com sucesso a tipagem de *L. monocytogenes* por cgMLST (Schmid *et al.*, 2014).

A persistência de estirpes de *L. monocytogenes* durante longos períodos de tempo, em queijarias, foi relatada por vários autores (Pintado *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2013; Kabuki *et al.*, 2004; Parisi *et al.*, 2013). É importante realçar que estirpes persistentes de *L. monocytogenes* em queijarias foram associadas a surtos de listeriose (McLauchlin *et al.*, 2004; Tompkin, 2002).

Esta persistência de estirpes de *L. monocytogenes* na indústria alimentar, está interligada com a ineficácia da limpeza e desinfecção, resultando na resistência das estirpes a concentrações mínimas inibitórias (CMI) dos desinfetantes (Martínez-Suárez *et al.*, 2016).

Tendo em conta o que foi referido anteriormente, este estudo pretendeu utilizar os métodos de tipagem por PFGE, serotipagem *PCR Multiplex* e WGS de forma a investigar quais as potenciais fontes de contaminação com *L. monocytogenes* numa queijaria do Sul de Portugal. Também se pretende avaliar a atividade bactericida dos desinfetantes usados pela queijaria, nas estirpes isoladas de alimentos e amostras ambientais provenientes da mesma queijaria.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. *Listeria monocytogenes*

#### 2.1.1. Aspetos históricos

*Listeria monocytogenes* foi descoberta por Murray *et al.*, em 1924, quando estudava uma epidemia que afetava coelhos e porcos numa quinta em Cambridge. Inicialmente, Murray atribuiu à bactéria o nome *Bacterium monocytogenes* devido à monocitose provocada por esta (Murray *et al.*, 1926).

Em 1927, durante as investigações de mortes inusitadas, observadas em gerbilos ou ratos-do-deserto, perto de Joanesburgo, África do Sul, Pirie descobriu um novo microrganismo, tendo nomeado o acontecimento como a "Doença do Rio Tigre", pela proximidade com o rio Tigre (Gray e Killinger, 1966; Pirie, 1927). Pirie rebatizou este novo agente microbiano de *Listerella hepatolytica*: "O organismo causador é um bacilo Gram-positivo para o qual, a partir do seu efeito patogénico, proponho o nome específico *hepatolytica* e o nome genérico *Listerella*, dedicando-o em honra de Lord Lister, um dos mais distintos nomes que se preocupam com a bacteriologia, cujo nome ainda não foi comemorado em nomenclatura bacteriológica" (Ryser e Marth, 2007). Murray e Pirie enviaram as suas estirpes para a Coleção Nacional do Instituto Lister, em Londres. O diretor Dr. Leningham, aferiu a semelhança dos dois microrganismos e colocou Murray e Pirie em contacto. Dada a semelhança entre elas, eles decidiram chamar a esta bactéria *Listerella monocytogenes* (Gray, 1966). No entanto, em 1939, a Comissão Judicial do Comité Internacional de Bacteriologia Sistemática rejeitou o nome genérico *Listerella* porque já tinha sido usado anteriormente para um micetozóario em 1906, em honra de Arthur Lister (irmão mais novo de Lord Lister) e por uma espécie de foraminífero em 1933 em honra de Joseph Jackson Lister (pai de Lord Lister).

Assim, Pirie em 1940, propôs o nome de *Listeria* como homenagem a Lord Joseph Lister (1827-1912), cirurgião inglês e pioneiro da higiene, que descobriu a origem bacteriana da infecção nas feridas e propôs o uso de antissépticos para a desinfecção dos utensílios, das mãos dos cirurgiões e das feridas (Iranzo *et al.*, 2015; Pirie, 1940). *L. monocytogenes* foi isolada pela primeira vez na espécie humana no ano de 1929 por Nyfeldt em Copenhaga (Nyfeldt, 1929).

*L. monocytogenes* foi considerada como um novo agente patogénico humano em 1980, amplamente distribuído no ambiente e potencial contaminante de quase todas as matérias-primas. Os surtos de listeriose demonstraram a gravidade desta doença, com altos níveis de mortalidade, na ordem de 35% (Rocourt *et al.*, 2003), principalmente em indivíduos imunodeprimidos, grávidas, recém-nascidos e idosos.

### 2.1.2. Taxonomia

Em 1986, no Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey, *Listeria* foi classificada com *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, *Renibacterium*, *Kurthia* e *Caryophanon* na seção de "Bacilos regulares, Gram-positivos, não esporulados" (Seeliger e Jones, 1986). A problemática da taxonomia intra e intergenérica do género *Listeria* durou alguns anos (Farber e Peterkin, 1991). Com base nas semelhanças morfológicas (bacilos, Gram-positivos, não esporulados), com a introdução e desenvolvimento da taxonomia numérica, quimiotaxonomia, hibridação de DNA, mais recentemente, de rRNA (RNA ribossómico) e a sequenciação de DNA, a posição filogenética de *Listeria* tem sido determinada com mais clareza (Ryser e Marth, 2007). Nas investigações iniciais, *Listeria* foi incluída no grupo das bactérias corineformes e actinomicetes apresentando uma posição indefinida. A partir de 1969, as bactérias do género *Listeria* apresentaram-se semelhantes a várias bactérias ácido-lácticas (Sohier *et al.*, 1948). Têm sido estudados vários marcadores quimiotaxonómicos, de forma a reforçar a distinção de *Listeria* das bactérias corineformes e a sua relação com as bactérias do ácido láctico. A percentagem de G + C (Guanina + Citosina) no DNA dos isolados de *Listeria monocytogenes* varia de 36 a 42% (Sohier *et al.*, 1948), indicando que *Listeria* pertence ao grupo de bactérias Gram-positivas com baixo teor de G + C (<55%).

A análise de rRNA 16S e 23S de *L. monocytogenes* veio contribuir para a clarificação da posição de *Listeria* em relação a outros géneros de bactérias Gram-positivas. Os resultados da sequenciação de rRNA e das propriedades quimiotaxonómicas, propuseram uma família separada para o género *Listeria*, a *Listeriaceae* (Ryser e Marth, 2007), como se observa na Tabela 1. Esta diferença entre *Lactobacillus* e *Listeria* foi confirmada pela sequenciação do rRNA 23S de *Listeria*, que exibiu maior semelhança com *Bacillus* e *Staphylococcus* (Sallen *et al.*, 1996).

Tabela 1: Caracterização taxonómica de *Listeria*.

Classificação Científica	
<b>Domínio</b>	Bacteria
<b>Filo</b>	Firmicutes
<b>Classe</b>	Bacilli
<b>Ordem</b>	Bacillales
<b>Família</b>	<i>Listeriaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Listeria</i>

Fonte: Iranzo *et al.*, (2015).

Em 2001, Glaser e colaboradores determinaram a sequência genómica completa de várias espécies de bactérias Gram-positivas. A comparação do conteúdo genético de *L. monocitogenes* com *Listeria innocua* mostrou uma perfeita conservação da ordem e da orientação relativa dos genes ortólogos, indicando alta estabilidade na organização do genoma e uma estreita relação filogenética (Glaser *et al.*, 2001). Além disso, foi observada uma sintonia elevada na organização do genoma de *Listeria* e *Bacillus*. Os mesmos resultados foram observados quando se comparou a organização do genoma de *L. monocitogenes* e *Staphylococcus aureus* (Glaser *et al.*, 2001). Assim, este estudo veio confirmar que *Listeria* exibe maior semelhança com *Bacillus* e *Staphylococcus*.

### 2.1.3. Espécies de *Listeria*

Até ao ano de 1948, *Listeria monocitogenes* tinha sido a única espécie reconhecida dentro do género *Listeria*, nesse mesmo ano *Listeria denitrificans* foi adicionada ao género devido à sua capacidade de reduzir os nitratos (Sohier *et al.*, 1948). Nos anos de 1966 e 1971, foram descobertas *Listeria grayi*, homenageando o microbiologista americano M. L. Gray (Larsen e Seeliger, 1966) e *Listeria murrayi*, cuja denominação é em honra do microbiologista canadiano E. G. D. Murray (Welshimer e Meredith, 1971), respetivamente. Em 1981, reportou-se *Listeria innocua*, denominada assim devido à sua inofensividade (Seeliger, 1981). Após 2 anos, em 1983 exibiu-se *Listeria welshimeri*, honrando H. J. Welshimer, bacteriologista americano e *Listeria seeligeri*, homenageando H. P. R. Seeliger, bacteriologista alemão (Rocourt e Grimont, 1983).

Em 1984, entrou no género *Listeria* a espécie *Listeria ivanovii*, em homenagem a I. Ivanovi, microbiologista búlgaro (Seeliger, 1984).

Com a evolução das tecnologias e da biologia molecular, foram necessários 26 anos de investigação para descobrir duas novas espécies de *Listeria*. Mais precisamente, em 2010 destacaram-se *Listeria marthii*, em honra do Professor Emérito E. H. Marth, pelas suas pesquisas e contribuições sobre *Listeria monocytogenes* (Graves *et al.*, 2010) e *Listeria rocourtiae*, nomeada em honra de J. Rocourt, bacteriologista francesa cujo trabalho teve um impacto importante sobre a taxonomia do género *Listeria* (Leclercq *et al.*, 2010).

No ano de 2013 foram inseridas mais duas espécies no género, *Listeria fleischmannii*, cujo epíteto específico remete para o nome de W. Fleischmann, um pioneiro na pesquisa de *Listeria* em produtos lácteos (Bertsch *et al.*, 2013) e *Listeria weihenstephanensis* enaltecendo os habitantes de Freising/Weihenstephan, sul da Alemanha, onde foi identificada (Halter *et al.*, 2013).

Em 2014, entraram para o género as espécies *Listeria floridensis*, em nome do estado dos EUA, Flórida, onde foi isolada; *Listeria aquatica*, porque foi isolada do meio aquático; *Listeria cornellensis*, em honra a Cornell, a universidade onde se realizaram a maioria dos estudos que levaram á sua descoberta; *Listeria riparia*, que provém de “riparia” que é a vegetação que se encontra nas margens de um rio ou riacho onde foi isolada e *Listeria grandensis*, em honra do condado *Grand*, onde foi isolada (den Bakker *et al.*, 2014).

No decorrer de 2015, destacaram-se mais duas espécies, a *Listeria newyorkensis*, remetendo para Newyorkensis, cidade que pertence ao Estado de Nova Iorque nos EUA, onde foi isolada e *Listeria booriae* em homenagem a Kathryn Boor, cientista de alimentos dos Estados Unidos da América que deu a sua contribuição para a compreensão da biologia da *Listeria* (Weller *et al.*, 2015).

Actualmente, o género *Listeria* é composto por dezassete espécies com nomes validamente publicados conforme descrito na Tabela 2.

*L. ivanovii* e *L. monocytogenes* são espécies consideradas patogénicas. *L. ivanovii* está mais associada a doença nos animais (nalguns casos foi associada a doenças em humanos) e *L. monocytogenes* capaz de causar doença em animais e humanos. As outras espécies não são consideradas patogénicas (Iranzo *et al.*, 2015).

Tabela 2: Espécies do género *Listeria* descritas ao longo dos anos.

<b>Espécie</b>	<b>Ano</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
<i>Listeria monocytogenes</i>	1940	Pirie, 1940
<i>Listeria denitrificans</i>	1948	Sohier <i>et al.</i> , 1948
<i>Listeria grayi</i>	1966	Larsen e Seelinger, 1966
<i>Listeria murrayi</i>	1971	Welshimer e Meredith, 1971
<i>Listeria innocua</i>	1981	Seeliger, 1981
<i>Listeria welshimeri</i>	1983	Rocourt e Grimont, 1983
<i>Listeria seeligeri</i>	1983	
<i>Listeria Noivanovii</i>	1984	Seeliger <i>et al.</i> , 1984
<i>Listeria marthii</i>	2010	Graves <i>et al.</i> , 2010
<i>Listeria rocourtiae</i>	2010	Leclerq <i>et al.</i> , 2010
<i>Listeria fleischmannii</i>	2013	Bertsch <i>et al.</i> , 2013
<i>Listeria weihenstephanensis</i>	2013	Halter <i>et al.</i> , 2013
<i>Listeria floridensis</i>	2014	
<i>Listeria aquatica</i>	2014	
<i>Listeria cornellensis</i>	2014	den Bakker <i>et al.</i> , 2014
<i>Listeria riparia</i>	2014	
<i>Listeria grandensis</i>	2014	
<i>Listeria newyorkensis</i>	2015	Weller <i>et al.</i> , 2015
<i>Listeria booriae</i>	2015	

Nota: A vermelho encontram-se as espécies que já não fazem parte do género *Listeria*.

## 2.2. Características morfológicas, culturais e bioquímicas

### 2.2.1. Morfologia

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva regular com extremidades arredondadas (0,5 µm de diâmetro e 1 a 2 µm de comprimento). As células são encontradas como unidades simples ou em cadeias curtas, podendo estar dispostas em formas de V e Y ou em paliçada. Esta bactéria não produz esporos nem cápsula (Seeliger e Jones, 1987). A mobilidade de *L. monocytogenes* deve-se aos poucos flagelos peritricos, quando incubada a temperaturas de 20 a 25 °C (Farber e Peterkin, 1991). Quando *L. monocytogenes* é incubada a 20 °C, em caldo de triptose a sua mobilidade característica é “*tumbling motility*” ou seja em cambalhota: as células começam com movimentos de torção o que origina rotações rápidas e excêntricas possibilitando a sua mobilidade em várias direções.

### 2.2.2. Características da cultura

Em agar nutritivo, as colónias apresentam dimensões de 0,2 a 0,8 mm de diâmetro, lisas, cinza azulado, translúcidas e ligeiramente concavas com uma textura superficial fina e margem completa após 24 horas de incubação (Ryser e Marth, 2007). Num período de 5 a 10 dias a temperaturas de refrigeração (2 a 4 °C), as colónias isoladas podem ter 5 mm ou mais de diâmetro (Ryser e Marth, 2007). Quando as culturas de *Listeria monocytogenes* incubam durante 18 a 24 h a 37 °C apresentam-se como colónias lisas, exibindo uma típica tonalidade azul-verde (Lachica, 1990), facilitando a sua identificação em placas contaminadas com outros microrganismos. Inoculada em caldo nutritivo, o meio torna-se turvo após 8 a 24 h de incubação a 37 °C, é produzida uma imagem típica de “chapéu de chuva”, a 0,5 cm abaixo da superfície, devido à natureza microaerofílica do microrganismo (Ryser e Marth, 2007).

*L. monocytogenes* é capaz de se desenvolver num amplo intervalo de temperaturas (-1.5 °C a 45 °C) (Farber e Peterkin, 1991; Junttila *et al.*, 1988; Seeliger e Jones, 1987) sendo a sua temperatura ótima de crescimento entre 30 °C a 37 °C. Este microrganismo cresce em ambientes de pH 4,5 a pH 9,2, mas o pH ótimo de crescimento é 7 (Ryser e Marth, 2007). Pode crescer a 10% (p/v) de NaCl e sobreviver a concentrações mais altas (Seeliger e Jones, 1986; Shahamat *et al.*, 1980). A sobrevivência a pH baixo e a altas concentrações de sal depende fortemente da temperatura (Cole *et al.*, 1990; Pintado *et al.*, 2005). A bactéria *L. monocytogenes* é um dos poucos agentes patogénicos transmitidos pelos alimentos que podem crescer com uma atividade da água ( $a_w$ ) abaixo de 0,93 (Ryser e Marth, 2007).

Segundo Premaratne *et al.* (1991), os fatores de crescimento incluem cistina, leucina, isoleucina, arginina, metionina, valina, cisteína, riboflavina, biotina, tiamina e ácido tiótico. O crescimento de *L. monocytogenes* é estimulado por  $\text{Fe}^{3+}$  e fenilalanina. A glicose e a glutamina são necessárias como fontes primárias de carbono e azoto, respetivamente.

### 2.2.3. Metabolismo e características bioquímicas

*Listeria monocytogenes* é aeróbia, microaerófila, facultativamente anaeróbia, catalase positiva e hemolítica (Romick *et al.*, 1996). A acetoina é um metabolito que não é produzido em condições anaeróbias. Somente hexoses e pentoses suportam o crescimento anaeróbio. A maltose e a lactose auxiliam o crescimento de algumas estirpes aerobicamente, mas a sacarose não (Romick *et al.*, 1996). O catabolismo da glicose prossegue pela via de Embden-Meyerhof tanto em ambientes aeróbios como anaeróbios (Seeliger e Jones, 1986). *L. monocytogenes* importa glicose por um sistema de fosfotransferase fosfoenolpiruvato dependente, de alta afinidade e um sistema proteico de baixa afinidade para sistema mediado (Phan-Thanh e Gormon, 1997). Todas as espécies de *Listeria* são vermelho metilo e Voges-Proskauer positivo. Produzem ácido a partir de amígdalina, cenobiose, frutose, manose, salicina, maltose, dextrina, alfa-metil-D-glucósido e glicerol. A produção de ácido a partir de galactose, lactose, melezitose, sorbitol, amido, sacarose e trealose é variável. Raramente é produzido ácido a partir de adonitol, arabinose, dulcitol, eritritol, glicogénio, inositol, inulina, melibiose, rafinose ou sorbose. A fenilalanino-aminase, a ornitina, a lisina, o indol, a urease, a arginina-descarboxilase e o  $\text{H}_2\text{S}$  não são produzidas por *Listeria monocytogenes* (Ryser e Marth, 2007).

### 2.3. Estrutura antigénica

As espécies de *Listeria* possuem múltiplos marcadores de superfície, tais como somáticos (O) e flagelares (H), que são úteis na deteção serológica. Existem 15 subtipos de antigénios somáticos (I–XV) e 4 subtipos flagelares (A–D) (Ludwig e Schleifer, 2009) e a combinação única destes antigénios determinam o serotipo de *Listeria*, como se pode ver na Tabela 3.

Tabela 3: Serotipos de *Listeria*.

Serotipos	Antigénios O	Antigénios H
1/2a	I, II, III	A, B
1/2b	I, II, III	A, B, C
1/2c	I, II, III	B, D
3a	II, III, IV, (XII), (XIII)	A, B
3b	II, III, IV, (XII), (XIII)	A, B, C
3c	II, III, IV, (XII), (XIII)	B, D
4a	III, (V), VII, IX	A, B, C
4ab	III, V, VI, VII, IX, X	A, B, C
4b	III, V, VI	A, B, C
4c	III, V, VII	A, B, C
4d	III, (V), VI, VIII	A, B, C
4e	III, V, VI (VIII), X	A, B, C
7	III, XII, XIII	A, B, C
5	III, V, VI, (VII), X	A, B, C
6a	III, V, (VI), (VII), (IX), XV	A, B, C
6b	III, (V), (VI) (VII), IX	A, B, C

( ) Os antigénicos entre parêntesis podem não estar presentes em todos os isolados.

Fonte: Ludwig *et al.* (2009).

As espécies de *Listeria* são divididas em 16 diferentes serotipos, 13 dos quais foram identificados em *Listeria monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7), quatro serotipos em *Listeria seeligeri* (1/2b, 4c, 4d e 6b), três em *Listeria innocua* (4ab, 6a e 6b), dois em *Listeria welshimeri* (6a e 6b) e o serotipo 5 em *Listeria ivanovii* (Ludwig *et al.*, 2009).

Atendendo à presença de antigénios O e H, a bactéria *L. monocytogenes* classifica-se em 4 serogrupos (1/2, 3, 4 e 7). A maioria dos casos de listeriose humana está associada aos serotipos 1/2a, 1/2b e 4b (Borucki e Call, 2003; Jacquet *et al.*, 2002; Liu, 2006; Wiedmann *et al.*, 1996). Através de métodos de tipagem genética, *L. monocytogenes* pode ser separada em quatro linhagens genéticas, linhagens I a IV, constituídas por serotipos específicos, linhagem I: serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e e 7; linhagem II: serotipos 1/2a, 1/2c, 3a e 3c, linhagem III: serotipos 4b, 1/2a, 4a e 4c e linhagem IV: serotipos 4a, 4c (Haase *et al.*, 2014). Cerca de 96% dos casos de listeriose humana relatados são causados pelas linhagens I e II (serotipos 1/2a, 1/2b, 4b) (Doumith *et al.*, 2004; Hyden *et al.*, 2016).

### 3. Listeriose

A listeriose ocorre como infecção generalizada, com septicemia ou como uma infecção localizada num sistema/órgão específico podendo definir duas formas da doença de acordo com a idade do hospedeiro: maternofetal/neonatal (período perinatal) ou listeriose em adultos (Schuchat *et al.*, 1991; Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

A listeriose é uma infecção zoonótica originada por bactérias do género *Listeria*. A maioria dos casos ocorre por ingestão de alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* mas esta última é raramente associada à doença humana (Guillet *et al.*, 2010).

Foram reportados casos de doença em pessoas que contactaram diretamente com animais infetados, manifestando-se como infecção cutânea (Tourdjman *et al.*, 2014). Também foi demonstrada a via de transmissão nosocomial através da contaminação cruzada no período neonatal. McLauchlin (1996) reportou 29 casos de listeriose em recém-nascidos no Reino Unido e 22 noutros países que nasceram aparentemente saudáveis e desenvolveram a doença após partilharem a enfermaria e os materiais utilizados pelas mesmas enfermeiras. Em oito casos que ocorreram no mesmo hospital e na mesma altura, foi identificado o óleo mineral como sendo a fonte da contaminação (Schuchat *et al.*, 1991).

Durante o parto, seja de humanos ou de outros animais, o elevado número de microrganismos presentes no aparelho genital materno ou nos instrumentos (contaminados durante o parto), pode conduzir à transmissão ao recém-nascido (McLauchlin, 1996).

Estima-se que em cada 1 600 casos de listeriose por ano, ocorram cerca de 260 mortes. A infecção é mais provável em grupos de risco como as mulheres grávidas e os seus recém-nascidos, adultos com idade igual ou superior a 65 anos e pessoas com sistemas imunitários enfraquecidos tais como doentes oncológicos, diabéticos, transplantados, indivíduos com hepatite ou vírus da imunodeficiência humana (HIV) (CDC, 2017b; EFSA e ECDC, 2016).

O período de incubação de *L. monocytogenes* é variável, convencionalmente de 4 a 60 dias (Goulet *et al.*, 2013). A infecção provocada por *L. monocytogenes* depende principalmente do estado imunitário do hospedeiro, da virulência da estirpe, da quantidade de inóculo e da composição do alimento, como por exemplo o teor em sal, atividade da água ( $a_w$ ) e acidez (Crum, 2002; McLauchlin, 1996).

A listeriose humana apresenta sazonalidade, ocorrendo mais casos no fim do Verão/Outono, em contraste com a sazonalidade da listeriose animal, que apresenta um pico na Primavera (Liu, 2008).

Existem duas formas de manifestação clínica, a listeriose invasiva e a não-invasiva. A listeriose invasiva, geralmente está associada a grupos de risco (CDC, 2017b), é manifestada por bacteremias, infecções do sistema nervoso central (SNC) como as meningites e infecções neonatais. Outras formas de listeriose invasiva, mas menos frequentes, são infecções ósseas-articulares e vasculares.

A listeriose invasiva apresenta uma mortalidade elevada, da ordem dos 20 a 30% (Tourdjman *et al.*, 2014). A prevalência de listeriose não-invasiva não é comum, mas pode também afetar pessoas saudáveis (CDC, 2017b), porém as formas pelas quais se manifesta são gastroenterites agudas, febres, infecções cutâneas isoladas ou excepcionalmente infecções oculares.

### 3.1. Formas de listeriose invasiva

Bacteremia é a forma mais frequente da listeriose invasiva e a mais reportada na União Europeia (Tourdjman *et al.*, 2014). Os sintomas não são específicos e estão associados a febres, calafrios e por vezes mialgias. A febre pode ser acompanhada por episódios de diarreia (Tourdjman *et al.*, 2014).

A listeriose em adultos (não gestantes) é tipicamente associada (50-70% dos casos) ao sistema nervoso central (SNC) apresentando, na maioria das vezes, meningoencefalite ou meningite (Vázquez-Boland *et al.*, 2001) e mais raramente abscessos cerebrais (Cone *et al.*, 2003; Dee e Lorber, 1986) e/ou na medula espinal (Morrison e Brown, 1980). *Listeria monocytogenes* é a terceira principal causa de meningite adulta, depois de *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* (Mylonakis *et al.*, 2002). Os sintomas mais comuns associados à infecção no SNC são febre, ataxia, convulsões, alteração do estado mental e perda de consciência (Schuchat *et al.*, 1991).

Na gravidez, a ocorrência de listeriose resulta de uma situação de imunossupressão celular moderada (Mylonakis *et al.*, 2002). A infecção geralmente ocorre durante o último terço de gestação, provavelmente devido à diminuição da imunidade celular observada neste período (Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007). Os sintomas da infecção com *L. monocytogenes* durante a gravidez geralmente são febre, por vezes associada a mialgia, artralgia, dor de cabeça ou dor nas costas.

A gravidade da listeriose materna e neonatal está relacionada com possíveis complicações, tais como aborto, morte fetal, parto prematuro, infecção fetal ou neonatal, progredindo na maioria dos casos em bacteremia ou meningite neonatal. Cerca de 60% dos casos de listeriose materna e neonatal são acompanhadas por sinais de infecção no recém-nascido (Tourdjman *et al.*, 2014). Em caso de transmissão ao recém-nascido, a infecção manifesta-se de duas formas: uma sepsia no prematuro ou recém-nascido, associada na maioria das vezes à contaminação no útero ou uma meningite tardia ocorrendo até duas semanas após o parto, geralmente associada à contaminação durante o parto.

Outras formas invasivas, raramente descritas, são conhecidas como sendo infecções ósseas e articulares (principalmente em idosos ou doentes imunocomprometidos), endocardite, infecção peritonite e miosite (Charlier *et al.*, 2012).

### 3.2. Formas de listeriose não invasiva

Em adultos saudáveis a infecção por *Listeria monocytogenes* é associada a uma gastroenterite aguda e autolimitante caracterizada por febre, diarreia não sanguinolenta, náuseas, vômitos e dor de cabeça.

Vários surtos de gastroenterite febril reportados têm sido associados a *L. monocytogenes*, os quais apresentam tipicamente um período de incubação de 24 horas e sintomas durante dois dias (Ooi e Lorber, 2005).

As taxas de bacteremia nas gastroenterites provocadas por *L. monocytogenes* não são documentadas, mas provavelmente serão baixas (cerca de 2,5%) (Hof, 2001).

### 3.3. Dose mínima infecciosa e mecanismos de infecção

A dose mínima infecciosa não está definida para os humanos. Contudo, ela pode variar, uma vez que depende da estirpe e do estado imunitário do hospedeiro. Vázquez-Boland *et al.* (2001), relataram que os alimentos implicados nalguns surtos apresentaram concentrações superiores a  $10^3$  UFC de *Listeria monocytogenes* por grama de alimento e que concentrações de *L. monocytogenes* inferiores a  $10^2$  UFC/g representaram um baixo risco para o consumidor, contudo podem ser suficientes para causar toxinfecção em grupos de risco.

O processo de infecção “*in vivo*” por *L. monocytogenes* (Figura 1-A) inicia-se após a ingestão de alimentos contaminados (Figura 1-A1), colonizando assim o trato digestivo. Caso a bactéria consiga atravessar a barreira intestinal (Figura 1-A2) e, após atingir os linfonodos metastáticos (MLN), consegue ter acesso à circulação sistêmica (Figura 1-A3).

Os órgãos-alvo principais da infecção por *L. monocytogenes* são o fígado e o baço (Figura 1-A4), que constituem reservatórios da bactéria se a infecção não for controlada pelo sistema imunitário. A libertação da bactéria na corrente sanguínea pode dar origem a septicemia.

*L. monocytogenes* tem capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e atingir o cérebro (Figura 1-A5), resultando em meningite ou encefalite. Nas mulheres grávidas, a passagem da barreira placentária (Figura 1-A6) pode levar ao aborto ou à infecção neonatal generalizada (Cossart e Lebreton, 2014; Gandhi e Chikindas, 2007).

Todo este mecanismo de infecção “*in vivo*” explica-se atendendo ao ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes* (Figura 1-B).

*L. monocytogenes* invade as células hospedeiras através de um mecanismo de “*zipper*”, o que requer a interação das suas internalinas, *InlA* e *InlB* com os respetivos recetores da membrana celular do hospedeiro (Figura 1-B1).

Posteriormente, esta bactéria segrega as proteínas listeriolisina *O* (*LLO*) e fosfatidilinositol fosfolipase *C* (*PI-PLC*), que são responsáveis pela capacidade de invasão e virulência desta bactéria, sendo capazes de lisar o vacúolo fagocítico e transitar para o citoplasma (Figura 1-B2) (Cossart e Lebreton, 2014; Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

Quando a bactéria é libertada para o citoplasma, pode multiplicar-se (Figura 1-B3) e estimular a polimerização da actina *A* (*ActA*), sintetizando filamentos de actina em forma de “cauda de cometa”, que permitem à bactéria deslocar-se até à membrana plasmática (Figura 1-B4) e propagar-se de célula para célula (Figura 1-B5). A rutura do vacúolo fagocítico (de duas membranas) é principalmente mediada pela ação da *LLO* e da *PI-PLC* (Figura 1-B6) (Cossart e Lebreton, 2014).

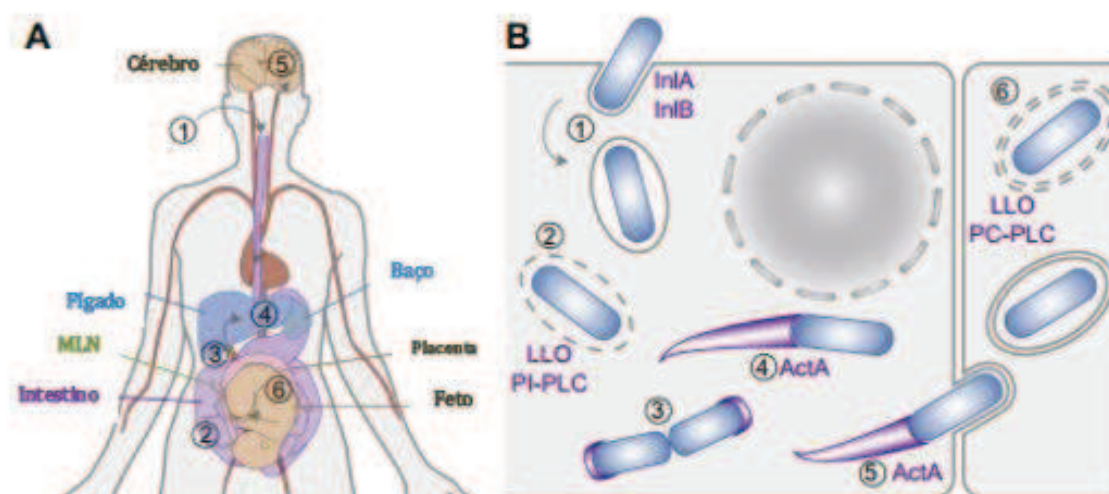


Figura 1: Mecanismo de infecção por *Listeria monocytogenes*.

Fonte: Cossarte Lebreton, (2014).

### 3.4. Diagnóstico

*Listeria monocytogenes* pode estar presente nas fezes dos humanos portadores assintomáticos. A bactéria foi isolada em cerca de 5% das amostras de fezes em pacientes assintomáticos e mais frequentemente em indivíduos que contactam com listeriose clínica (Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007).

O agente da listeriose pode ser isolado a partir de uma amostra de sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR) (Schuchat *et al.*, 1991), líquido amniótico (Janakiraman, 2008), placenta, mecónio, lóquios, líquido proveniente de lavagem gástrica ou zaragatoa do ouvido do recém-nascido, diretamente semeada numa placa de gelose de sangue e incubada a 35 °C durante 24 horas. Pode também ser isolado a partir de uma cultura de fezes recorrendo primeiro a um enriquecimento seletivo para *Listeria* e depois inoculação em meio seletivo (Allerberger e Wagner, 2010). No caso de listeriose neonatal, *L. monocytogenes* pode ser isolada a partir de amostras de líquido conjuntivo, mecónio, ouvidos, nariz, garganta, líquido amniótico, placenta, sangue ou líquido cefalorraquidiano (LCR) (Tourdjman *et al.*, 2014).

### 3.5. Procedimento legal

Em Portugal, o Despacho n.º 15385-A/2016 publicado no *Diário da República*, 2.<sup>a</sup> série — N.º 243 — 21 de dezembro de 2016, do Ministério da Saúde/Direção-Geral da Saúde, obriga à notificação da listeriose através do SINAVE (Sistema Nacional de Informação de Vigilância Epidemiológica).

De acordo com este despacho, o diagnóstico de listeriose a uma pessoa deve obedecer a pelo menos um dos três critérios:

- Listeriose no recém-nascido que resulta em morte neonatal ou listeriose no 1.º mês de vida, se evidenciar um dos seguintes critérios: granulomatose séptica; meningite ou meningoencefalite; septicémia; dispneia; lesões cutâneas das membranas ou da conjuntiva.
- Listeriose durante a gravidez apresentando um dos seguintes critérios: aborto, espontâneo ou provocado, morte neonatal ou nascimento prematuro; febre ou sintomas gripais.
- Outra forma de listeriose definida por pelo menos um dos critérios seguintes: febre; meningite ou meningoencefalite; septicémia; infeções localizadas tais como artrite, endocardite e abscessos.

### 3.6. Tratamento

A listeriose geralmente requer hospitalização. Apesar de quase todas as estirpes de *Listeria monocytogenes* serem suscetíveis à maioria dos antibióticos, a taxa de cura é de apenas 70%. A escolha de eleição é a combinação de aminopenicilina (amoxicilina ou ampicilina) com aminoglicosídeo (gentamicina) (Hof, 2004).

Em mulheres grávidas alérgicas à penicilina, deve ser usada vancomicina como alternativa (Bennett *et al.*, 2014). *L. monocytogenes* é naturalmente resistente às cefalosporinas, oxacilina, fosfomicina e aztreonam, que não devem ser usados neste tipo de infeção (Charlier-Woerther *et al.*, 2009).

As doses prescritas são elevadas e a duração do tratamento é prolongada: 2 a 3 semanas para neonatos, 2 a 4 semanas para adultos imunodeprimidos com meningite e bacteremia. O tempo de tratamento pode ser alargado para casos complicados, tais como endocardite (Schlech, 2000).

### 3.7. Prevenção

A ampla distribuição de *Listeria monocytogenes* no ambiente facilita a sua entrada nas indústrias alimentares e, atendendo às suas características (multiplicação a temperaturas de refrigeração, produção de biofilmes), contribui para que *L. monocytogenes* consiga persistir nas instalações por longos períodos de tempo. Assim, a entrada de *L. monocytogenes* nas indústrias é inevitável, mas a contaminação dos alimentos pode ser reduzida através de uma higiene minuciosa (Schlech, 2000).

Para eliminar os agentes patogénicos da cadeia alimentar é fundamental um controlo apertado em todas as variáveis de uma unidade fabril, bem como a respetiva monitorização. Deve apostar-se na formação dos trabalhadores, pois são eles os responsáveis pela produção e/ou transformação dos produtos alimentares. Estes, além de serem potenciais fontes de entrada de microrganismos nas instalações, podem igualmente ser responsáveis pelas contaminações cruzadas, quando são negligenciadas as boas práticas de fabrico (BPF) dos alimentos e as boas práticas de higiene (BPH) (Iranzo *et al.*, 2015).

A educação dos consumidores é de extrema importância para a prevenção da listeriose, que afeta preferencialmente os grupos de risco (mulheres grávidas e recém-nascidos, idosos e doentes imunocomprometidos).

A prevenção da listeriose é fundamental para estes indivíduos, evitando o consumo de alguns alimentos, bem como o cumprimento de certas regras de higiene no manuseamento e preparação dos alimentos em casa. A comunidade médica deve dar o primeiro passo na informação das pessoas (Liu, 2008).

### 3.8. Epidemiologia

Segundo o Relatório da União Europeia (UE) sobre as doenças e as fontes de zoonoses, agentes zoonóticos e surtos de origem alimentar em 2015 da EFSA, durante o período 2008-2015, observou-se um padrão sazonal nos casos de listeriose notificados na união europeia/agência europeia do ambiente (EEA), com picos de Verão grandes seguidos de picos de Inverno mais baixos (EFSA e ECDC, 2016).

Apesar da significativa tendência de aumento neste período, o número de casos estabilizou em 2015. Onze Estados-Membros (França, Alemanha, Grécia, Hungria, Malta, Países Baixos, Polónia, Roménia, Eslováquia, Eslovénia e Suécia) apresentaram tendências crescentes desde 2008. Nenhum dos Estados-Membros registou uma tendência decrescente entre 2008 e 2015 (EFSA e ECDC, 2016). Dezoito Estados-Membros, incluindo Portugal, forneceram pela primeira vez informações sobre as hospitalizações para todos ou a maioria dos seus casos.

Verificou-se um aumento de 38,0% de todos os casos confirmados em 2014 para 44,9% em 2015 (EFSA e ECDC, 2016). Entre os casos confirmados, 97,4% foram hospitalizados (EFSA e ECDC, 2016). A listeriose tem a maior proporção de casos hospitalizados de todas as zoonoses sob vigilância da UE.

O resultado foi relatado para 1 524 casos confirmados (69,1%). Dezanove Estados-Membros relataram 270 mortes por listeriose em 2015, o maior número de óbitos anuais registados desde 2008 (média anual: 166 óbitos). A letalidade global da UE entre os casos com resultado conhecido foi de 17,7%. A França registou o maior número de casos fatais (75), seguida da Alemanha (45). As infeções por *Listeria monocytogenes* foram mais comumente relatadas na faixa etária acima de 64 anos. A proporção de casos nessa faixa etária tem aumentado de 56,2% em 2008 para 64,1% em 2015, e especialmente na faixa etária acima de 84 anos com um aumento de 7,3% para 12,8% (EFSA e ECDC, 2016).

## 4. *Listeria monocytogenes* - Disseminação ambiental

*Listeria monocytogenes* apresenta uma distribuição ambiental generalizada, desde o solo, vegetação em decomposição, lamas, águas fluviais, esgoto e alimentação animal. O seu reservatório natural é o meio ambiente (Seeliger e Jones, 1987) mas também funcionam como reservatório os animais domésticos e selvagens (EFSA e ECDC, 2014). Este microrganismo tem a capacidade de persistir em ambientes que coloniza, por vezes por longos períodos de tempo.

### 4.1. *Listeria monocytogenes* nos animais

*Listeria monocytogenes* pode infetar muitas espécies de animais, incluindo mamíferos, peixes, aves e crustáceos. Enquanto a maioria dos animais infetados são portadores assintomáticos, a listeriose é principalmente sintomática em ruminantes, incluindo bovinos, ovinos e caprinos (Hunt *et al.*, 2013). Nestes animais, a doença pode manifestar-se como encefalite, bacteremia ou causar abortos.

Alguns estudos referem que a exposição oral dos animais ruminantes a alimentos contaminados pode levar ao desenvolvimento de mastites e posteriormente à contaminação do leite, com alterações organolépticas mínimas (Tourdjman *et al.*, 2014). Existe uma correlação entre a prevalência de *L. monocytogenes* no animal, no ambiente de processamento do leite e a alimentação animal à base de silagem.

O isolamento de *L. monocytogenes* foi 3 a 7 vezes mais provável em explorações que forneceram silagem durante todo o ano do que em explorações que não o fizeram (Schoder *et al.*, 2011).

Os animais infetados por *L. monocytogenes* por longos períodos de tempo, podem por sua vez contaminar o seu próprio ambiente (Lida *et al.*, 1991). Na exploração, a contaminação de *L. monocytogenes* pode propagar-se do ambiente para os animais e também de animal para animal (Ho *et al.*, 2007).

A contaminação do equipamento de ordenha com fezes também pode ocorrer. Durante o armazenamento de leite cru, *L. monocytogenes* pode crescer e multiplicar-se, mesmo em condições refrigeradas (Yilmaz *et al.*, 2009).

A infeção do úbere por *L. monocytogenes* é mais comumente relatada em ovinos e caprinos (Low e Donachie, 1997), principalmente as mastites que podem causar a contaminação do leite cru (Walker e Morgan, 1993). O leite cru pode ser contaminado pelo ambiente ou pela excreção direta no leite (Pintado *et al.*, 2009; Hunt *et al.*, 2013), levando à contaminação de produtos alimentares feitos com leite cru, como é o caso do queijo.

## **4.2. *Listeria monocytogenes* nos alimentos**

Ao longo dos anos, os diversos surtos de listeriose relatados, têm tido origem nos alimentos (Farber e Peterkin, 1991). A elevada prevalência de *Listeria monocytogenes* em alimentos e a elevada taxa de mortalidade associada à listeriose, fazem com que esta bactéria seja considerada um perigo para a saúde pública (Farber e Peterkin, 1991).

A matriz alimentar pode afetar o crescimento de *L. monocytogenes*, assim como a acidez gástrica pode comprometer a sobrevivência do agente patogénico (McLauchlin *et al.*, 2004). Contudo, a listeriose tem sido associada a uma ampla gama de produtos hortícolas, de carnes, laticínios e frutos do mar indicando uma ampla gama de interações com diferentes matrizes alimentares (McLauchlin *et al.*, 2004). Alguns alimentos proporcionam microambientes que protegem o microrganismo, como é o caso de alimentos com alto teor de gordura (McLauchlin *et al.*, 2004).

*L. monocytogenes* está presente em diversos tipos de animais, vegetais ou águas. Por este motivo é frequente a contaminação de matérias-primas e de alimentos não processados, sendo os alimentos não sujeitos a tratamento térmico mais suscetíveis de permitir a presença desta bactéria.

Embora os produtos carneos de charcutaria, prontos para consumo e os queijos de pasta mole tenham sido inicialmente considerados como as principais categorias de alimentos de alto risco de listeriose em seres humanos, os resultados dos inquéritos de pesquisa de alimentos e as investigações de surtos no mundo, na década passada, ampliaram significativamente a lista de alimentos implicados, acrescentando diversos produtos prontos para consumo, como produtos lácteos, de peixe e da pesca, mas também frutas e saladas (Garner e Kathariou, 2016).

Atualmente, os alimentos prontos para consumo são os que causam maior preocupação, uma vez que oferecem características que permitem o crescimento de *L. monocytogenes*, tais como serem altamente processados, apresentarem uma data de durabilidade mínima alargada, serem conservados a temperaturas de refrigeração e consumidos sem nenhum processamento térmico.

Estes alimentos, particularmente aqueles que são compostos por carne e saladas, preparados e/ou vendidos por vendedores nas ruas têm sido reconhecidos como potenciais veículos de doenças de origem alimentar (Iannetti *et al.*, 2016).

*L. monocytogenes* pode contaminar os alimentos em diferentes fases de produção. Os alimentos mais perigosos são os consumidos crus ou deficientemente cozinhados, como peixe fumado, leite cru ou queijos feitos com leite cru. Os alimentos submetidos a um processamento térmico durante a sua preparação também podem sofrer contaminação cruzada por *L. monocytogenes*.

De acordo com o Regulamento (CE) n.º 2073/2005, e subseqüentes alterações, os critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios para *L. monocytogenes* são os seguintes:

- Em alimentos prontos para consumo destinados a lactentes e destinados a fins medicinais específicos, *L. monocytogenes* não deve estar presente em 25 g de alimento, nos produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil.

Nota: Não se aplica aos alimentos prontos para consumo que tenham recebido um tratamento térmico ou outro tratamento eficaz para eliminar *L. monocytogenes*; produtos hortícolas e frutas frescos, não cortados e não transformados, excluindo sementes germinadas; pão, bolachas e produtos similares; águas engarrafadas ou embaladas, refrigerantes, cerveja, cidra, vinho, bebidas espirituosas e produtos similares; açúcar, mel e produtos de confeitaria, incluindo produtos de cacau e de chocolate e moluscos bivalves vivos.

- Em alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitir o crescimento de *L. monocytogenes*, exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos, não deve estar presente em níveis que excedam as 100 UFC/g, nos produtos colocados no mercado durante o período de vida útil do alimento. Os alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitir o

crescimento de *L. monocytogenes*, exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos, devem apresentar ausência em 25g, antes de o alimento deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produziu.

- Em alimentos prontos para consumo não suscetíveis de permitir o crescimento de *L. monocytogenes*, exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos, não deve estar presente em níveis que excedam as 100 UFC/g, nos produtos colocados no mercado durante o período de vida útil do alimento.

Nota: Os produtos com um pH < 4,4 ou com  $a_w < 0,92$ , os produtos com um pH < 5,0 e com  $a_w < 0,94$  e os produtos com um período de vida útil inferior a 5 dias são automaticamente considerados como pertencentes a esta categoria. Podem também pertencer a esta categoria outros tipos de produtos, sujeitos a justificação científica.

### 4.3. Incidência

O padrão epidemiológico da listeriose baseia-se em surtos ocasionais (Rocourt *et al.*, 2003). O estudo de Noordhout *et al.* (2014) foi o primeiro a estimar o número global de casos de listeriose humana. Estimou-se que, a nível mundial, em 2010, a listeriose resultou em 23 150 casos, tendo 5 463 culminado em morte.

#### 4.3.1. Incidência em Portugal

Almeida *et al.* (2006) realizaram um estudo retrospectivo sobre a listeriose em Portugal e compilaram os casos identificados entre os anos de 1994 e 2003. De acordo com este estudo foram registados 35 casos de listeriose com uma taxa de mortalidade de 37,5%. Segundo este estudo o ano com mais casos foi o de 2003, com uma incidência de pelo menos 1,4 casos por milhão de habitantes. Este valor representa apenas uma estimativa pois nem todas as unidades de saúde do país foram contactadas. Contudo, quando existe suspeita de listeriose é obrigatório, desde dezembro de 2016 notificar os casos de listeriose às autoridades de saúde.

Em 2010, Almeida e colaboradores compilaram os casos de listeriose diagnosticados em Portugal entre 1994 e 2007. Foram identificados 95 casos de listeriose, durante o período do estudo. A partir das informações disponíveis em 81 casos, 85,2 e 14,8% correspondiam a infeções materno-neonatal (MN) e não-MN, respetivamente.

Para os 69 casos não-MN confirmados foram isoladas estirpes a partir de amostras de sangue (58,0%), de líquido cefalorraquidiano (34,8%) e a partir de outras amostras (7,2%). A razão de sexo (masculino/feminino) de casos confirmados não-MN foi de 2,3. A idade média dos casos não-MN foi de 60 anos, com 38 casos (55,9%) (Almeida *et al.*, 2010).

Pita (2012) investigou o surto ocorrido em Lisboa e Vale do Tejo que decorreu entre outubro de 2010 e março de 2011 em Portugal. No total foram analisadas 167 amostras, entre as quais 57 zaragatoas e 110 amostras de géneros alimentícios; 42 estabelecimentos de retalho foram inspecionados, cobrindo 20 localidades, e seis indústrias foram fiscalizadas, encaminhando para uma aproximação ao foco (ou um dos focos) do surto ocorrido. Na sequência das amostras positivas de queijo de vaca e cabra fresco produzidas por uma das indústrias de lacticínios fiscalizadas, foram tipadas por PFGE e apresentaram o mesmo pulstotipo detetado a nível hospitalar nos seres humanos infetados. Tais resultados indicam que provavelmente os doentes desenvolveram a doença após o consumo deste alimento contaminado.

#### 4.3.2. Prevalência nos alimentos

De acordo com o relatório da União Europeia sobre tendências e fontes de zoonoses, agentes zoonóticos e surtos de origem alimentar em 2015 (EFSA e ECDC, 2016) conclui-se que entre as amostras de produtos da pesca prontos para consumo, colhidas em indústrias alimentares, o nível de não conformidades (3,5% das amostras individuais e 2,9% dos lotes) foi o mais baixo comparado com os anos anteriores. Contudo, os produtos piscícolas prontos para consumo são a categoria de alimentos que apresenta o nível mais alto de não conformidades. Na distribuição, o nível de não conformidades (0,3% das amostras individuais e 1,4 % dos lotes) foi muito mais baixo do que o observado nos alimentos colhidos na indústria transformadora.

Nos queijos de pasta mole e semi-dura, o baixo nível de incumprimento foi observado nas amostras com origem na indústria transformadora (1,3% das amostras individuais e 0,6% dos lotes). Dezasseis amostras foram colhidas na indústria transformadora, oito das quais não cumpriram o critério microbiológico “ausente em 25 g de alimento” de acordo com o Regulamento (CE) n.º 2073/2005. Na distribuição, os níveis de não conformidades foram baixos em amostras de lotes (1,0%) e muito mais baixos em amostras individuais (0,2%).

Supõe-se que os queijos de pasta dura não suportem o crescimento de *L. monocytogenes*. Todas as unidades testadas respeitaram o critério de  $\leq 100$  UFC/g tanto na indústria como na distribuição (EFSA e ECDC, 2016).

Entre as amostras de alimentos prontos para consumo de origem carne, com exceção das salsichas fermentadas, observaram-se baixos níveis de não conformidades na transformação (2,1% de amostras individuais e 1,6% de lotes).

Na distribuição, todos os lotes testados foram encontrados em conformidade e os níveis muito baixos de não-conformidade foram relatados em amostras individuais (<0,1%) (EFSA e ECDC, 2016).

Considera-se que as salsichas fermentadas não suportam o crescimento de *L. monocytogenes* e que todos os produtos testados cumprem o critério de segurança alimentar  $\leq 100$  UFC/g tanto na indústria como na distribuição (EFSA e ECDC, 2016).

Tal como nos anos anteriores, todas as amostras de alimentos prontos para consumo, destinados a lactentes e para fins medicinais especiais estavam em conformidade com os critérios de segurança alimentar de *L. monocytogenes*, tanto na transformação como no comércio. A percentagem de unidades individuais não conformes das principais categorias de alimentos prontos para consumo observam-se na Figura 2. Em 2015, as categorias de alimentos prontos para consumo com os níveis mais elevados de incumprimento no comércio retalhista foram os «produtos da pesca» (0,3% de amostras individuais e 1,4% de lotes) e «queijos de pasta mole e semi-dura» (0,2% de amostras individuais e 1,0% de lotes) (EFSA e ECDC, 2016).

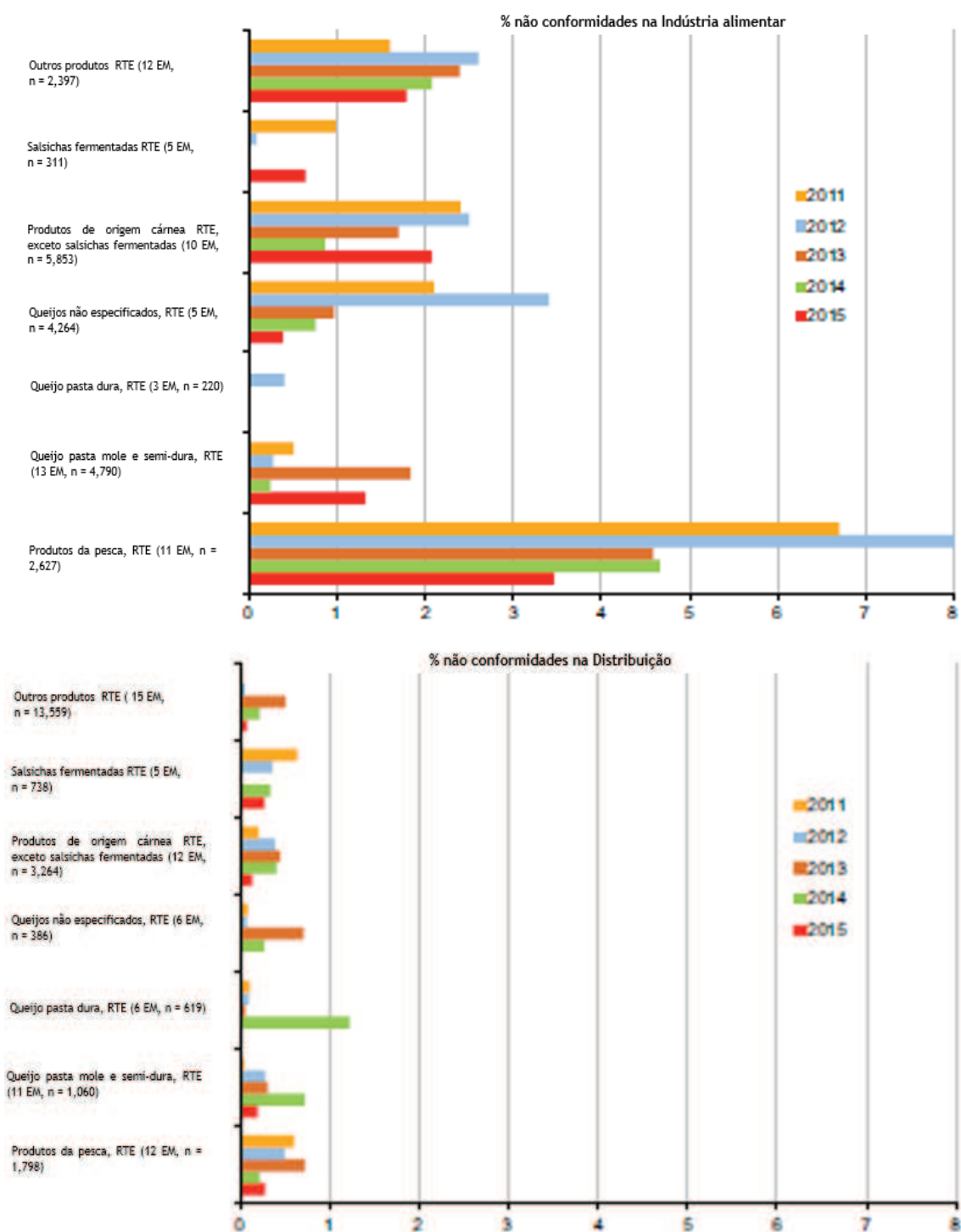


Figura 2: Proporção de amostras individuais da indústria alimentar e distribuição não conformes com os critérios de segurança alimentar da EU para *Listeria monocytogenes*, 2011-2015. RTE: pronto a consumir. Entre parênteses, o número de Estados Membros (EM) que relataram dados sobre a categoria específica de alimentos em 2015 e o número total das unidades testadas (n).

Fonte: EFSA e ECDC, (2016).

Nos Estados Unidos da América, o Centro de Controlo e Prevenção de Doença (*Centers for Disease Control and Prevention, CDC*), é a agência de saúde pública responsável por reportar os surtos multissetoriais de alimentos envolvendo *L. monocytogenes* desde 1998. Atendendo à informação disponível *online* no *Foodborne Outbreak Online Database (FOOD Tool)* é possível verificar as ocorrências de listeriose nos Estados Unidos da América e os alimentos associados, como evidencia a Tabela 4.

Tabela 4: Ocorrência de listeriose de 2011 a 2017 nos Estados Unidos da América.

Alimento	Nº Hospitalizados	Nº de Mortes	Ano Ocorrência
Meloa	143	33	2011
Queijo fresco	22	4	2012
Queijo pasta mole	6	1	2013
Produtos lácteos	7	1	2014
Queijo	4	1	2014
Rebentos de feijão	5	2	2014
Gelados	10	3	2015
Queijos pasta mole	28	3	2015
Saladas embaladas	19	1	2016
Leite cru	2	1	2016
Vegetais congelados	9	3	2016
Queijo pasta mole	2	2	2017

Fonte: “Foodborne Outbreak Online Database (FOOD Tool)”, <https://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/>.

## 5. *Listeria monocytogenes* na indústria queijeira

Os alimentos envolvidos em surtos de listeriose são, na sua maioria, industrializados (Barancelli *et al.*, 2011). A produção do leite favorece a contaminação dos produtos lácteos por *Listeria monocytogenes*. O leite cru pode ser uma fonte de introdução de *L. monocytogenes* na indústria (Waak *et al.*, 2002) mas existem outras potenciais fontes de contaminação como as solas das botas e vestuário dos colaboradores, os utensílios, equipamentos e superfícies contaminadas, o sistema de ventilação, os ralos e os carros de transporte (Rocourt e Cossart, 1997; Swaminathan, 2001).

Vários surtos de listeriose têm sido associados ao consumo de leite cru ou produtos feitos com leite cru resultando em várias centenas de casos (Lundén *et al.*, 2004). O leite cru pode ser contaminado com *L. monocytogenes* através da excreção pelo úbere, dos equipamentos de ordenha mal higienizados e de animais com mastite.

A mastite congénita parece rara, mas pode resultar numa elevada concentração de *L. monocytogenes* no leite. Existem descrições de *L. monocytogenes* em queijos feitos a partir de leite cru onde a fonte de contaminação era apenas um animal no rebanho de ordenha com mastite subclínica provocada por *L. monocytogenes* (Delhalle *et al.*, 2012; Pintado *et al.*, 2009; Schoder *et al.*, 2008 ).

As instalações e os equipamentos das indústrias alimentares constituem uma fonte de contaminação, sobretudo quando não são postas em prática as boas práticas de fabrico (BPF), e de higiene (BPH) o que favorece o aparecimento de focos de contaminação (Tompkin, 2002). Existe interesse por parte da indústria queijeira na deteção de *L. monocytogenes*, devido à associação da bactéria presente no ambiente de processamento com o produto final.

Estudos de biologia molecular têm mostrado que algumas estirpes de *L. monocytogenes* persistem nas indústrias, onde permanecem residentes por meses ou anos (Di Ciccio *et al.*, 20012; Le Monnier e Leclerq, 2009), constituindo fontes permanentes de contaminação (Tompkin, 2002). A persistência da bactéria no ambiente industrial está relacionada com a adaptabilidade desta bem como à sua facilidade na formação de biofilmes (Doijad *et al.*, 2015). Dado que a persistência de *L. monocytogenes* nas instalações industriais pode ser contínua, o seu controlo deve ser realizado aplicando procedimentos de higienização e BPF (Tompkin, 2002).

Em Portugal é obrigatório a implementação de sistemas de auto controlo, baseados nos princípios do sistema *Hazard Analysis and Critical Control Point* (HACCP) a todos os operadores do sector alimentar, tendo de se reger pelo Regulamento (CE) n.º 852/2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios, de forma a reduzir a contaminação ambiental e minimizar a contaminação dos produtos, prevenindo assim casos de listeriose humana (ILSI, 2005) ou outras doenças que ponham em causa a saúde do consumidor.

## 5.1. Produção de queijo

Há uma longa tradição de queijos em Portugal, tendo o consumo anual total de queijo *per capita* sido de 11,8 kg, em 2015 (INE, 2016). A produção de queijo implica várias fases, que vão desde a preparação da matéria-prima até ao acabamento final do queijo.

Segundo a norma geral do *Codex Alimentarius* para o queijo, queijo é um produto maturado ou não maturado de pasta mole, semi-dura, dura ou extra-dura, podendo ser revestido e no qual a relação proteína/caseína do soro não excede a do leite.

O queijo pode ser obtido por coagulação total ou parcial da proteína do leite, do leite desnatado, do leite parcialmente desnatado, da nata, do soro ou leitelho, ou de qualquer combinação destes, através da ação de coalho ou de outros agentes coagulantes adequados e por drenagem parcial do soro resultante da coagulação.

O queijo é um produto que se caracteriza pelo conjunto de ações físicas, químicas e microbiológicas exercidas sobre o leite e os seus componentes, por via de diversos fatores de transformação e agentes químicos e biológicos, naturais do leite, adquiridos ao longo da transformação, ou ainda adicionados ao longo do processo de fabrico.

O consumidor associa a qualidade do queijo aos sinais intrínsecos do mesmo como a cor, textura, aparência e consistência (Steenkamp e Van Trijp, 1996). No caso dos produtos tradicionais, a qualidade está intimamente ligada à riqueza e diversidade sensorial, difícil de traduzir por palavras mas que um apreciador consegue "sentir" e "desfrutar", embora, na conjuntura atual, os aspetos relacionados com a segurança alimentar não possam, também neste caso, deixar de ser considerados (Martins e Vasconcelos, 2003).

Seguidamente, estão descritas as etapas gerais da produção dos queijos tradicionais portugueses.

O processo de fabrico inicia-se com a receção do leite na queijaria. Durante a trasfega do leite, deverá proceder-se simultaneamente à filtração do mesmo, através de um filtro próprio ou pano adequado para retenção de casuais sujidades. O Regulamento (CE) nº 1662/2006 refere que no caso de o leite não ser processado imediatamente após a receção, deve ser refrigerado abaixo dos 6°C até à sua transformação. Segundo a alínea 1, do ponto 1, do capítulo 1 do regulamento anteriormente referido o leite cru deve provir de animais que:

- não apresentem quaisquer sintomas de doenças infecciosas transmissíveis aos seres humanos através do leite;
- se encontrem em bom estado geral de saúde, não apresentem sinais de doença que possam resultar na contaminação do leite e, em especial, não sofram de qualquer infecção do tracto genital com descarga, de enterite com diarreia e febre ou de uma inflamação reconhecível do úbere;
- não apresentem qualquer ferida do úbere susceptível de afectar o leite;
- aos quais não tenham sido administradas substâncias ou produtos não autorizados e que não tenham sido objecto de um tratamento ilegal na aceção da Directiva 96/23/CE;
- em relação aos quais, em caso de administração de substâncias ou produtos autorizados, tenha sido respeitado o intervalo de segurança prescrito para esses produtos ou substâncias.

A coagulação é o fenómeno fundamental do fabrico de queijo. A tradição queijeira nacional utiliza a coagulação enzimática.

Os coagulantes normalmente utilizados são complexos enzimáticos que podem ser de origem animal, o comum coalho, ou de origem vegetal, o conhecido cardo, muito ligado aos queijos de ovelha portugueses com Denominação de Origem Protegida (DOP) e considerado um dos fatores responsáveis pela tipicidade de alguns queijos tradicionais (Martins e Vasconcelos, 2003).

O tipo de leite é outro fator importante no processo de coagulação, nomeadamente o seu teor de caseína e de cálcio, bem como as características das caseínas, que são responsáveis pela eficácia da transformação, mas também pelas características da coalhada e do futuro queijo. É ao nível do teor e das características específicas das caseínas que podemos encontrar a grande diferença entre os queijos de vaca, de ovelha e de cabra (Martins e Vasconcelos, 2003). O comportamento do leite das três espécies é bastante diferente no processo de coagulação interferindo nas características do queijo.

Outro fator importante é o tipo de coagulante. A sua ação não se reduz à fase enzimática da coagulação, mas executa-se até ao final da mesma e, posteriormente, ao nível da maturação do queijo, por intermédio da fração residual que permanece no produto. O tipo de coagulante é caracterizado pela relação C/P (atividade específica de coagulação/atividade proteolítica não específica) (Martins e Vasconcelos, 2003).

É adicionado sal à coalhada com o objetivo de condimentar o produto mas também de baixar o  $a_w$  por osmose, de forma a conservar o produto, evitando a sua deterioração microbiológica (Guinee e Fox, 2004). Os métodos de salga são variáveis, destacando-se a submersão dos queijos em tanques de salmoura, a salga na massa e a salga a seco (Guinee e Fox, 2004).

O dessoramento pressupõe a expulsão do soro para que se consiga um produto moldável (Martins e Vasconcelos, 2003). Para o dessoramento, usam-se diversos processos, como o corte da coalhada, de modo a aumentar a superfície de expulsão do soro, a temperatura, a agitação da coalhada e a prensagem manual que facilita a saída do soro.

De seguida faz-se a moldagem, isto é, a massa é colocada em cinchos ou formas montadas com diversos moldes que dão a forma e o tamanho final que se pretende para o queijo. Após a moldagem é realizada uma prensagem, que tem como objetivo apertar a massa expulsando mais soro. A intensidade e a duração da prensagem são fatores a considerar, consoante a variedade do queijo. A prensagem normalmente é realizada por processo mecânico (Martins e Vasconcelos, 2003).

Os tempos de cura variam com as características desejáveis para os queijos. Em ambiente industrial, a cura é efetuada em câmaras climatizadas que recriam as melhores condições de cura, independentemente das condições ambientais externas (Noronha *et al.*, 2005).

Após o período de cura desejado, o queijo é lavado e rotulado. A rotulagem deve estar de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1169/2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios.

Na Figura 3, está representado um fluxograma típico do fabrico de queijo de ovelha.

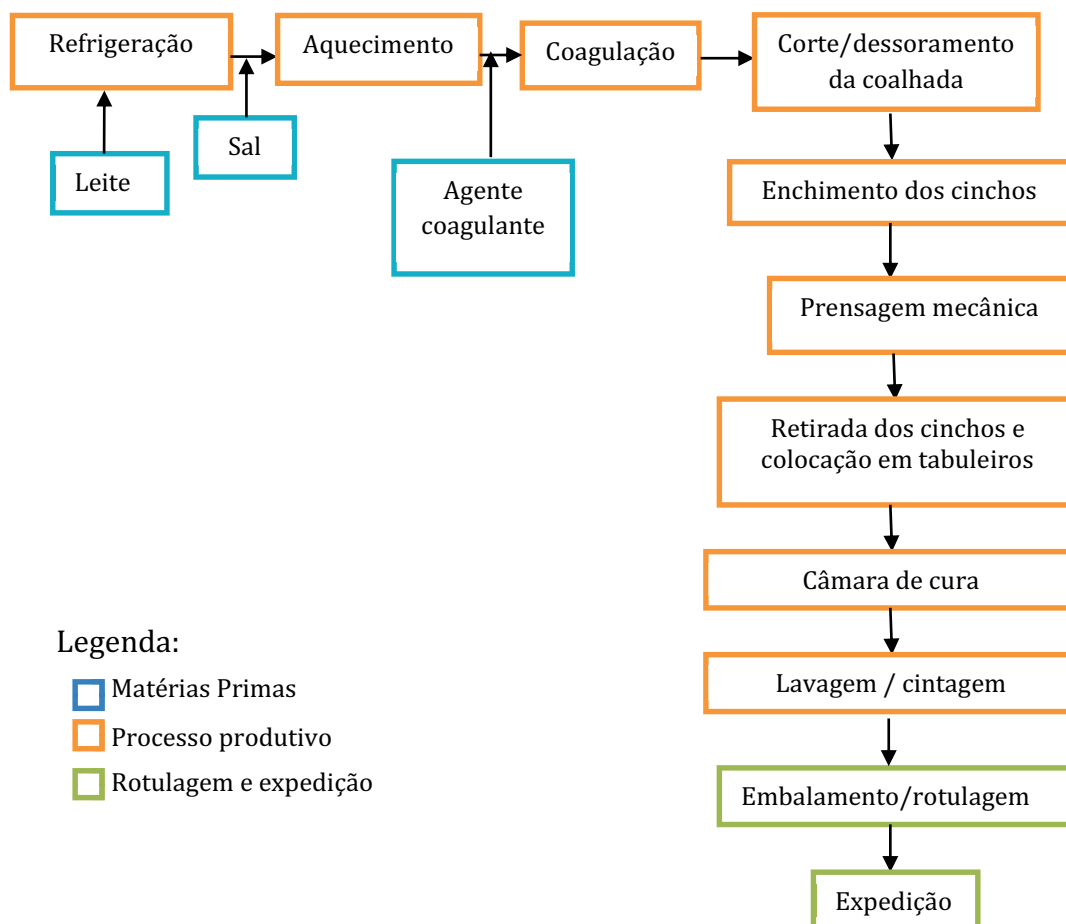


Figura 3: Fluxograma geral da produção de queijo.

Fonte: Ferreira (2010).

## 5.2. HACCP na indústria queijeira

Conforme referido anteriormente, em Portugal é obrigatória a implementação de sistemas de autocontrolo baseados nos princípios do sistema HACCP. Esta obrigatoriedade está prevista no Regulamento (CE) n.º 852/2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios. No artigo 5º deste regulamento não se estabelece unicamente a obrigatoriedade da implementação do sistema, como também se indica a necessidade de manter os procedimentos permanentes baseados no HACCP.

HACCP é um sistema que permite o controlo dos alimentos, baseado na prevenção. Resumindo, o sistema HACCP é aplicado através de uma série de passos simples que consistem em “compreender o produto”, questionando o que o torna seguro, compreender o ambiente operacional e as atividades do processo; identificar potenciais perigos e decidir onde estes podem ocorrer no processo; instalar medidas preventivas com limites de segurança definidos; monitorizar os pontos de controlo e formular registos (Mortimore e Wallace, 2013).

Todos os tipos de perigos à segurança alimentar são considerados como parte do sistema HACCP - biológicos, químicos e físicos. A aplicação efetiva de um sistema de segurança alimentar baseado no sistema HACCP deverá fornecer aos operadores da indústria alimentar, a confiança de que os alimentos que produzem são seguros (Mortimore e Wallace, 2013).

O objetivo é assegurar a produção de um alimento de qualidade e comprová-la, através de documentos elaborados. Como tal, é necessário identificar, avaliar e controlar os perigos provenientes das matérias-primas bem como os perigos inerentes a cada etapa de produção. Desta forma, é necessário identificar os pontos críticos de controlo (PCC's) onde pode ser assinalado qualquer aspeto sobre o qual se podem adotar medidas preventivas ou de controlo e onde a falta desse controlo pode resultar num risco para o consumidor (Mortimore e Wallace, 2013).

## 5.3. *Listeria monocytogenes* em queijos

Da análise de dados de surtos notificados internacionalmente entre 1988 e 2007 verifica-se que 337, de um total de 4 093, estavam associados a produtos lácteos e 6,6% foram atribuídos a *Listeria monocytogenes* (Greig e Ravel, 2009). O queijo tem sido implicado em alguns dos principais surtos de listeriose relatados em todo o mundo (Bille *et al.*, 2006; Warriner e Namvar, 2009).

*L. monocytogenes* foi detetada em diferentes tipos de queijo português com taxas de contaminação variando de 1,6% a 26,2% (Almeida *et al.*, 2007). Pintado *et al.* (2005) estudou 63 queijos de pasta mole elaborados a partir de leite cru de ovelha com métodos tradicionais, na província da Beira Baixa (Portugal), no período de 1995-1996. Nos 63 queijos estudados detetou *L. monocytogenes* em 29 (46%).

Dada a capacidade de *L. monocytogenes* crescer/sobreviver a temperaturas entre 0 °C e 45 °C, a valores de pH variando entre 4,5 e 9 e em meio salino com 10 a 20% (p/v) de NaCl (Le Monnier e Leclercq, 2009), a prevenção do estabelecimento de *L. monocytogenes* numa indústria queijeira é essencial.

## 6. Persistência de *Listeria monocytogenes* na indústria alimentar

A listeriose está frequentemente associada a alimentos prontos para consumo (RTE) (Iannetti *et al.*, 2016). Os alimentos RTE que possuem a capacidade de promover o crescimento de *Listeria monocytogenes*, como o queijo, têm sido envolvidos em casos de listeriose humana. Um exemplo disso é o surto de listeriose nos EUA em março do ano corrente (CDC, 2017a) que causou dois mortos, sendo o queijo o alimento responsável.

A contaminação do ambiente de produção das indústrias tem sido relatada como a principal via de contaminação dos alimentos RTE por *L. monocytogenes* (Carpentier e Cerf, 2011). As indústrias produtoras de queijo são caracterizadas por apresentarem condições favoráveis ao crescimento de *L. monocytogenes* (Spanu *et al.*, 2015).

Estirpes de *L. monocytogenes* têm sido frequentemente isoladas dos pavimentos, dos ralos, dos equipamentos e superfícies da indústria alimentar, nomeadamente dos locais refrigerados, embora estes sejam rotineiramente limpos e desinfetados levando à consideração que se trata de uma contaminação das instalações (Carpentier e Cerf, 2011). Na revisão bibliográfica de Møretrø e Langsrud (2004), são citados 21 estudos nos quais a persistência de estirpes de *L. monocytogenes* foi demonstrada ou assumida.

Tem-se observado que os biofilmes de *L. monocytogenes* resistem à limpeza, desinfecção, dessecação e radiação UV, aumentando a sua probabilidade de persistir nas instalações das indústrias produtoras de queijo (Lee *et al.*, 2017). Um estudo realizado por Doijad *et al.* (2015) revelou que *L. monocytogenes* pode formar biofilmes em superfícies industriais em 24 h, que aparentemente a formação de biofilmes depende de estirpes individuais e do seu crescimento e que as fissuras presentes nas superfícies industriais de contacto com alimentos fornecem um local ideal para a formação de biofilmes. Embora a maioria das estirpes de *L. monocytogenes* formasse biofilmes moderados a fracos, o ambiente de produção de alimentos pode abrigar biofilmes multicelulares, aumentando a prevalência de *L. monocytogenes*.

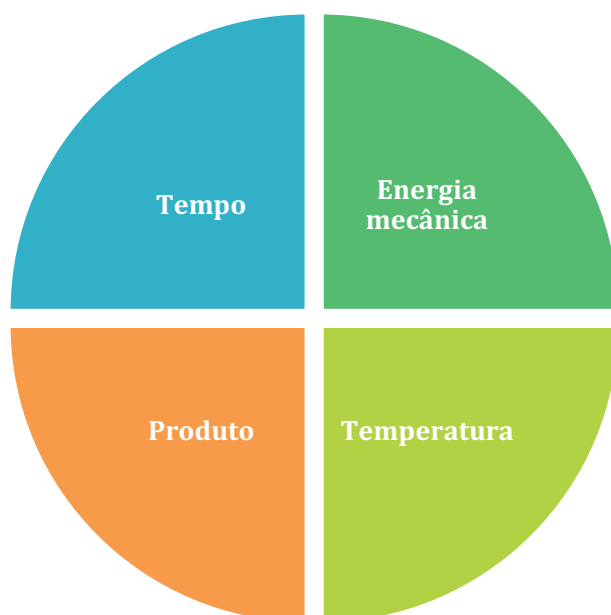
Assim, o controlo total de *L. monocytogenes* nas instalações de indústrias produtoras de alimentos prontos para consumo, como é o caso do queijo, é extremamente difícil (Carpentier e Cerf, 2011).

A melhoria da higiene na indústria alimentar, passa por projetar os procedimentos de higiene de forma mais frequente e eficaz, escolher os desinfetantes mais indicados para cada tipo de indústria, bem como a forma de aplicação e a concentração do desinfetante mais eficaz.

A higienização de equipamentos e instalações consiste numa série de operações de limpeza e desinfecção destinadas à manutenção das condições de higiene das superfícies em contacto com o queijo e do ambiente de trabalho.

## 6.1. Limpeza

A primeira parte do programa de higienização é a limpeza, cujo objetivo é a separação ou o desprendimento de qualquer tipo de sujidade aderente às superfícies, objetos e utensílios e a sua posterior eliminação, juntamente com a solução de limpeza, durante a fase de enxaguamento. A limpeza permite eliminar a sujidade de origem orgânica e inorgânica, de forma a preparar as superfícies para uma boa atuação dos desinfetantes. Além disso, uma boa limpeza permite a redução da quantidade de microrganismos presentes nas superfícies (Holah, 1995). A eficácia da fase de limpeza depende da combinação de quatro fatores, classicamente representados no círculo de Sinner (Figura 4) (Iranzo *et al.*, 2015).



**Figura 4:** Círculo de Sinner, representando os fatores relevantes nas operações de limpeza.

Fonte: Iranzo *et al.* (2015).

De acordo com este esquema, os fatores que determinam a eficácia da limpeza são o tempo de atuação da solução de limpeza, a temperatura da solução, a quantidade e natureza do detergente usado e a energia mecânica aplicada durante o processo de limpeza.

Estes parâmetros estão estritamente interligados, o que quer dizer que se houver uma diminuição no tempo de limpeza, necessariamente se terá que aumentar a temperatura, a quantidade de detergente e a energia mecânica utilizada (Iranzo *et al.*, 2015). A sujidade é geralmente constituída por um aglomerado de partículas heterogêneas, tanto do ponto de vista da origem, como da sua natureza química, dimensão e estrutura física, unidas entre si por uma substância aderente denominada matriz. O conhecimento do tipo de sujidade a eliminar permitirá escolher os produtos, sistemas e condições mais adequadas de forma a otimizar a limpeza (Iranzo *et al.*, 2015).

Os detergentes utilizados no processo de limpeza podem ser agrupados em três grupos, atendendo ao seu pH. Como representado na Tabela 5, existem detergentes ácidos, neutros e alcalinos.

**Tabela 5:** Categorias dos detergentes utilizados no processo de limpeza.

Detergentes	Princípio ativo	Aplicação
<b>Ácidos</b>	Ácidos fortes (ex: ácido sulfúrico, fosfórico ou nítrico)	Resíduos inorgânicos, como incrustações calcárias
<b>Neutros</b>	Substâncias neutras	Equipamentos e pavimentos sensíveis aos produtos corrosivos
<b>Alcalinos</b>	Hidróxidos alcalinos: Hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio	Resíduos orgânicos, como gorduras, proteínas, e polissacarídeos

Fonte: Iranzo *et al.* (2015).

Outra classificação dos detergentes baseia-se na sua capacidade de formar espuma durante a aplicação. A capacidade de formação de espuma, embora não acrescente nenhum efeito adicional de limpeza, facilita as operações uma vez que aumenta o tempo de contacto da solução de limpeza em superfícies inclinadas e verticais, permite identificar as zonas onde não se aplicou a solução de limpeza e permite detetar a ausência de detergente na solução (Iranzo *et al.*, 2015). Assim, utilizam-se detergentes espumantes para a limpeza de superfícies abertas e de fácil acesso como os cinchos, a francela e a prensa numa indústria produtora de queijo.

No caso de equipamentos com circuitos, cubas e tanques, a formação de espuma não é desejável, por isso usam-se detergentes que não geram espuma ou que contenham na sua composição tensioativos (Iranzo *et al.*, 2015).

## 6.2. Desinfecção

Enquanto a limpeza tem por objetivo a eliminação de resíduos de todo o tipo, a desinfecção centra-se em eliminar ou inativar os microrganismos presentes, até alcançar níveis que se considerem seguros.

A manutenção da higiene nas instalações das indústrias alimentares é principalmente baseada na aplicação de desinfetantes nas superfícies de contacto com os alimentos, precedida pela limpeza com diferentes detergentes para facilitar a ação dos desinfetantes. Os produtos desinfetantes apresentam uma classificação geral semelhante à dos detergentes relativamente à sua capacidade de formação de espuma, o que determina as suas áreas de aplicação (Iranzo *et al.*, 2015). No caso dos desinfetantes, a sua composição química é a chave no momento de selecionar o produto mais adequado às necessidades da indústria alimentar.

Em particular, a substância ativa biocida ou a combinação das mesmas, determina a capacidade biocida do desinfetante que irá afetar diversos componentes da estrutura celular das bactérias. Na Tabela 6 apresentam-se as substâncias ativas biocidas mais utilizadas na indústria alimentar.

**Tabela 6:** Substâncias ativas biocidas dos desinfetantes comumente utilizados nas indústrias alimentares e os seus mecanismos de atuação.

<b>Substância biocida</b>	<b>Alvo celular</b>	<b>Mecanismo de atuação</b>
<b>Glutaraldeído</b>	Parede celular, membrana citoplasmática	Cruzamento de proteínas
<b>Compostos quaternários de amónia</b>	Membrana citoplasmática	Danos na bicamada fosfolipídica da membrana citoplasmática
<b>Halogénios</b>	Componentes celulares	Inibição da síntese de DNA, oxidação dos grupos tiol em enzimas e proteínas
<b>Peróxido de hidrogénio</b>	Componentes celulares	Rutura das cadeias de DNA, oxidação dos grupos tiol em enzimas e proteínas.
<b>Ácido paracético</b>	Componentes celulares	Degradação de grupos tiol em enzimas e proteínas.
<b>Biguanida polimérica</b>	Membrana citoplasma	Libertação de lipossacarídeos da parede celular das bactérias Gram negativas, extração de iões potássio do citoplasma.
<b>Álcoois</b>	Membrana citoplasmática e proteínas	Degradação da membrana citoplasmática, interferência com o metabolismo celular e lise celular.

Fonte: McDonnell e Russell, (1999).

### 6.2.1. Eficácia dos desinfetantes contra *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* pode sobreviver à desinfecção, multiplicar-se a temperaturas de refrigeração e formar biofilmes (Gandhi e Chikindas, 2007).

Os biofilmes são difíceis de remover dos equipamentos de processamento de alimentos e as bactérias nos biofilmes são muitas vezes mais resistentes aos detergentes e desinfetantes do que as células planctónicas (Carpentier e Cerf, 2011; Donlan, 2002). Estudos anteriores identificaram numerosos genes associados à formação de biofilmes por *L. monocytogenes* a 30°C-37°C, em vez de temperaturas associadas ao processamento de alimentos (10°C -20°C). Não se sabe se os genes envolvidos na formação dos biofilmes diferem nas temperaturas de processamento dos alimentos, mas pode ser provável, considerando que a temperatura ambiental altera a hidrofobicidade da superfície celular, a motilidade e a expressão de outros fatores genéticos (Piercey *et al.*, 2016) em *L. monocytogenes*.

Suspeita-se que a persistência esteja ligada à resistência de estirpes aos desinfetantes. No entanto, ainda não existe consenso quanto ao termo resistência. Segundo Carpentier e Cerf (2011) o termo "resistência" é utilizado para descrever uma situação em que, quando se aplica um desinfetante com a concentração recomendada como bactericida, a extensão da morte observada é menor do que o esperado.

A indústria alimentar está efetivamente interessada na destruição/morte de uma proporção adequada da população bacteriana e, por conseguinte, deve sempre aplicar a concentração recomendada pelas instruções de utilização, a chamada "concentração em utilização", podendo ser igual ou superior à concentração mínima bactericida (CMB), determinado de acordo com as normas do Comité Europeu de Normalização (CEN). No entanto, a maioria dos autores, embora também usem a palavra "resistência", relacionam-na com experiências realizadas em concentrações subletais próximas da concentração mínima inibitória (CMI).

### 6.2.2. Atividade bactericida dos desinfetantes químicos

Os métodos europeus normalizados para avaliar a atividade bactericida de um desinfetante baseiam-se na determinação da concentração de desinfetante que produz um determinado número de reduções decimais (denominadas reduções lg) de uma população microbiana suspensa em meio líquido, durante um determinado tempo e uma determinada temperatura (com ou sem a presença de uma substância de interferência). As substâncias de interferência podem ser proteínas, hidratos de carbono e/ou lípidos que se podem misturar com o desinfetante de forma a reduzir a concentração de moléculas disponíveis para interagir com as bactérias.

As bactérias sobreviventes são contabilizadas num meio contendo um agente *quenching* para neutralizar o desinfetante testado e permitir distinguir as bactérias cujo crescimento foi inibido das bactérias que foram mortas.

A Norma Europeia EN 1040/2005 é um dos protocolos elaborados pelo CEN, que se baseia num método de suspensão quantitativa. O método foi especialmente

desenvolvido para avaliar a atividade bactericida básica de desinfetantes químicos e antissépticos e descreve a metodologia e requisitos necessários para a elaboração do teste.

## 7. Métodos laboratoriais

### 7.1. Métodos convencionais

A nível mundial existem vários métodos de isolamento de *Listeria monocytogenes*. Nos EUA, o método convencional aplicado é “Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Ready-To-Eat Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Samples” do *Food Safety and Inspection Service* (FSIS) e do *United States Department of Agriculture* (USDA) (USDA e FSIS, 2017, Hitchins *et al.*, 2016).

Na Europa, as Normas ISO 11290-1 e ISO 11290-2, para a pesquisa e contagem de *L. monocytogenes*, respetivamente, recomendadas pelo Regulamento (CE) n.º 2073/2005 e subsequentes alterações, são utilizadas pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP. O método para a deteção de *L. monocytogenes* consiste numa etapa de enriquecimento primário, seguido de um enriquecimento secundário e, posteriormente, inoculação em dois meios sólidos seletivos: o meio cromogéneo ALOA (Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti) e outro à escolha do laboratório (tal como o Oxford Agar ou o PALCAM Agar). As colónias de *L. monocytogenes* no meio ALOA são verde-azuladas, com cerca de 1 mm de diâmetro, e apresentam-se rodeadas por um halo opaco (Figura 5-A.). No meio Oxford Agar as colónias de *Listeria* spp. apresentam um halo negro à sua volta (devido à hidrólise da esculina do meio) e são umbilicadas após 48 horas de incubação (Figura 5-B).

A contagem de *L. monocytogenes* pelo método estabelecido na Norma ISO 11290-2 permite determinar o número de Unidades Formadoras de Colónia (UFC) de *L. monocytogenes* por grama de amostra, através da sementeira das diluições necessárias em meios sólidos seletivos como ALOA ou Oxford Agar. Após o isolamento das colónias suspeitas nos meios seletivos, deve ser efetuado o teste de coloração de Gram (Figura 5-D) e o teste de mobilidade. *L. monocytogenes* é produtora de hemolisinas, exibindo um halo de  $\beta$ -hemólise em gelose sangue (Figura 5-C), utiliza a ramnose como fonte de açúcares e exibe positividade no teste CAMP (Christie Atkins Munch Peterson) (Ludwig e Schleifer, 2009).

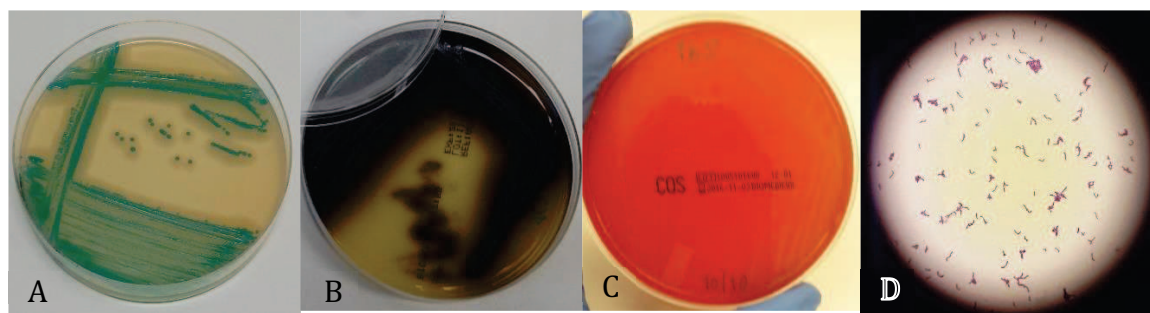


Figura 5: Meios sólidos seletivos para *Listeria*. A: ALOA, B: Oxford, C: Hemólise, D: Coloração Gram.

Fonte própria.

## 7.2. Métodos Rápidos

Devido à necessidade de a indústria expedir rapidamente para o mercado o produto que está em processo de análise, desenvolveram-se numerosas técnicas de análise que reduzem os tempos de obtenção de resultados. Na década de 70 os métodos rápidos (alternativos) fizeram crescer o mercado e tornar os métodos rápidos cada vez mais específicos e sensíveis. O sistema VIDAS® (bioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, França) é um teste imunoenzimático, “ELISA” (Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay) que se baseia em reações anticorpo-antigénio detetáveis através de reações enzimáticas. VIDAS® LMO2 (bioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, França) é um kit de desempenho elevado projetado para a deteção específica de *L. monocytogenes* em produtos alimentares, em 48 horas. Este método rápido tem-se destacado pela simplicidade, especificidade, sensibilidade e conveniência como método de triagem (Franco, 2006), sendo muito utilizado na indústria alimentar e em laboratórios, estando validado de acordo com a Norma ISO 16140-2:2016.

Outros métodos rápidos para a pesquisa e identificação de *L. monocytogenes* baseiam-se em *Kits* fabricados por várias empresas que desenvolveram técnicas de diagnóstico de laboratório (Iranzo *et al.*, 2015). Alguns dos métodos rápidos estão identificados na Tabela 7.

Tabela 7: Métodos rápidos para a pesquisa e identificação/confirmação de *Listeria monocytogenes* disponíveis no mercado.

<b>Método</b>	<b>Nível ID</b>	<b>Princípio</b>	<b>Duração</b>	<b>Empresa</b>	<b>Utilização</b>
<b>MICRO-ID <i>Listeria</i></b>	<i>L. monocytogenes</i> <i>L. innocua</i>	Reação enzimática	24 h	Organon Teknika	Confirmação
<b>Vitek - System</b>	<i>L. monocytogenes</i> <i>L. innocua</i>	Provas bioquímicas	24 h	bioMérieux	Confirmação
<b>Api <i>Listeria</i></b>	<i>L. monocytogenes</i>	Provas bioquímicas	24 h	bioMérieux	Confirmação
<b>MicroLog System</b>	<i>L. monocytogenes</i>	Uso de substratos como fonte de carbono	4 ou 24 h	Biolog	Confirmação
<b>MICROBACT 12L</b>	<i>L. monocytogenes</i>	Utilização de hidratos de carbono e prova de microhemólise	4-6 ou 24 h	Microgen	Confirmação
<b>Sherlock Microbial Identification System (MIS)</b>	<i>L. monocytogenes</i> <i>L. innocua</i>	Padrões de ácidos gordos	90 min	Microbial ID	Confirmação
<b><i>Listeria</i> Tek ELISA</b>	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 h	Organon Teknika	Deteção
<b>Vidas <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> (LMX)</b>	<i>L. monocytogenes</i>	ELISA	24 h	bioMérieux	Deteção
<b>Transia Plate <i>L.</i> <i>monocytogenes</i></b>	<i>L. monocytogenes</i>	ELISA	50 h	Diffchamb	Deteção

Fonte: Iranzo *et al.*, (2015).

### 7.3. Métodos de tipagem molecular

Atualmente, os métodos de tipagem moleculares mais utilizados são os seguintes: serotipagem; ribotipagem; fagotipagem; *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE); *amplified fragment length polymorphism* (AFLP); *random amplified polymorphic DNA* (RAPD); REP and ERIC *elements-based PCR*; *multilocus sequence typing* (MLST); *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) e *whole genome sequencing* (WGS) (Jadhav *et al.*, 2012).

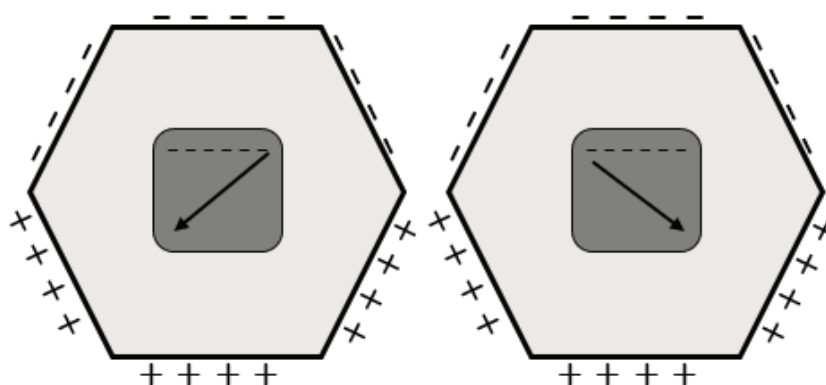
Dado que o presente trabalho assenta em três destes métodos de tipagem, PFGE, serotipagem e WGS, estes irão ser seguidamente abordados com mais detalhe.

#### 7.3.1. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

As técnicas de eletroforese em gel de agarose permitem a separação de fragmentos de DNA fornecendo enormes vantagens na biologia molecular. No entanto, até 1984, estas técnicas de eletroforese eram incapazes de separar fragmentos de DNA muito grandes de forma eficaz (Schwartz e Cantor, 1984). Em 1984, na Universidade da Columbia, foi desenvolvido um sistema de eletroforese baseado no princípio da reorientação alternada do campo elétrico que utiliza campos elétricos pulsados, dispostos na perpendicular em relação à direção do gel (Schwartz e Cantor, 1984).

Várias modalidades da metodologia PFGE foram descritas incluindo a eletroforese em gel de campo ortogonal (Carle e Olson, 1984), eletroforese de campo alternada transversal (Gardiner *et al.*, 1986), eletroforese em gel de inversão de campo (FIGE) (Carle *et al.*, 1986) e a eletroforese de campo elétrico (CHEF) (Chu *et al.*, 1986). Atendendo que todos estes métodos são alternativos à eletroforese em campo pulsado, apenas o CHEF é hoje utilizado na maioria dos laboratórios (Goering, 2010).

O sistema CHEF caracteriza-se por oferecer uma disposição de 24 elétrodos (Figura 6) produzindo um gradiente de eletroforese altamente uniforme, forçando os fragmentos de DNA a mudarem continuamente de direção, utilizando pulsos com um ângulo de 120°. Esta configuração produz uma migração de DNA equidistante para a esquerda e para a direita do centro de gel de agarose resultando numa migração retilínea ao longo do gel. Como em todos os métodos de eletroforese, o CHEF é influenciado por fatores como a concentração e a espessura do gel de agarose, a composição do tampão e a força do campo elétrico (V/cm) (Goering, 2010).



**Figura 6:** Funcionamento do sistema CHEF.

Fonte própria.

Neste sistema, um aumento gradual no tempo do impulso elétrico em diferentes direções permite a separação de fragmentos de DNA maiores (isto é, de 10 kb a 10 Mb), resultantes da digestão do DNA com enzimas de restrição que efetuam cortes pouco frequentes no DNA. As enzimas de restrição geralmente utilizadas para digestão de *L. monocytogenes* são a *Ascl* e *Apal* (Wiedmann, 2002).

As enzimas de restrição *Ascl* e *Apal* geram, respetivamente, 6 a 12 e 14 a 17 fragmentos na gama de separação da PFGE. As combinações dos perfis gerados pelas duas enzimas são utilizadas para caracterizar as estirpes (Felix *et al.*, 2012). A Tabela 8 evidencia a especificidade de cada enzima utilizada no método PFGE.

**Tabela 8:** Características das enzimas de restrição utilizadas.

Enzima de restrição	Secção de corte no DNA	Temperatura de restrição	Microrganismo
<i>Ascl</i>	5'...G↓CGCGC...3' 3'...CGCGC↑G...5'	37 °C	<i>L. monocytogenes</i>
<i>Apal</i>	5'...GGGCC↓C...3' 3'...C↑CCGGG...5'	25 °C	<i>L. monocytogenes</i>
<i>XbaI</i>	5'...T↓CTAGA...3' 3'...AGATC↑T...5'	37°C	<i>Salmonella</i> Braenderup H9812

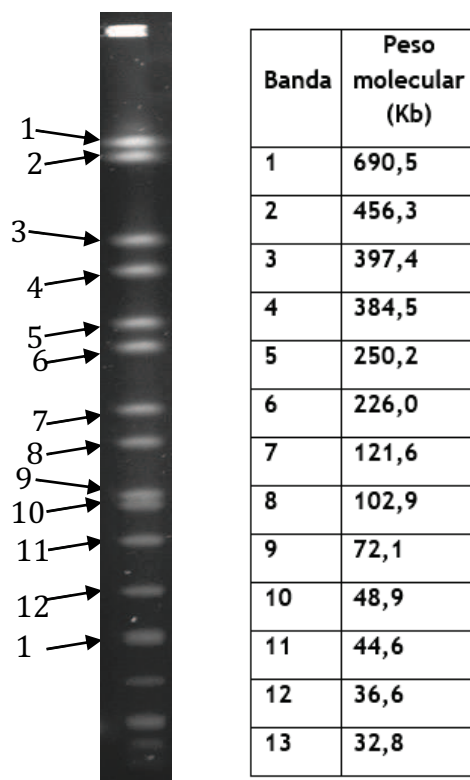
Fonte: *Product information* (Thermo Scientific, Vilnius, Lituânia).

Para controlar a restrição é utilizada a estirpe de referência *Salmonella* Braenderup H9812, estabelecida pelo protocolo PulseNet para PFGE de *L. monocytogenes*. Esta bactéria é digerida pela enzima *XbaI*, tendo o resultado desta digestão a função de enquadrar o perfil analisado para permitir um processo de normalização eficiente, devendo ser colocado a pelo menos cada 6 amostras, respeitando a colocação a cada extremidade do gel.

O perfil PFGE do marcador (Figura 7) deve ser visível e facilmente interpretado de forma a ser possível posicionar todas as suas bandas com precisão. As bandas do marcador servem como referência aquando a identificação das bandas obtidas pela digestão do DNA de *L. monocytogenes* pela *Ascl* e *Apal* (Felix *et al.*, 2012).

A tipagem por PFGE tem sido aceite como o método “*Gold Standard*” para a avaliação das relações epidemiológicas para a maioria das bactérias clinicamente relevantes (Goering, 2010). É considerada uma ferramenta valiosa na rastreabilidade das semelhanças entre estirpes de *L. monocytogenes* isoladas dos alimentos e/ou indústrias alimentares (Fox *et al.*, 2011).

A rede PulseNet International tem proposto ao longo dos anos, vários protocolos de PFGE padronizados para o estudo de bactérias patogénicas transmitidas por alimentos, incluindo *L. monocytogenes*, permitindo a criação de bases de dados para a comparação de estirpes em todo o mundo (Martin *et al.*, 2006).



**Figura 7:** Representação e identificação do número de bandas e respetivo peso molecular obtidos para *Salmonella* Braenderup H9812 após digestão com a enzima *XbaI*.

Fonte: Felix *et al.*, (2012).

### 7.3.2. Serotipagem

A serotipagem foi o primeiro método de tipagem molecular utilizado em *Listeria monocytogenes*. A serotipagem clássica de *L. monocytogenes* é baseada em reações de aglutinação utilizando antissoros específicos para diferentes antigénios presentes na superfície das células. Os antissoros são obtidos a partir de coelhos imunizados com diferentes serotipos de *L. monocytogenes*. O método de serotipagem é baseado em antigénios somáticos (O) e flagelares (H). Os antigénios O são estruturas diferenciadas da parede celular, como os ácidos lipoteicóicos e proteínas membranares, e os antigénios H são estruturas diferenciadas dos flagelos (Sjöman, 2010).

A serotipagem convencional tem a desvantagem de depender da qualidade dos antissoros preparados com estirpes padronizadas, de ser um método dispendioso, demorado, apresentando baixa reprodutibilidade, que requer mão-de-obra qualificada capaz de detetar as reações de aglutinação (Doumith *et al.*, 2004).

Para contornar estas limitações, foi desenvolvido um ensaio de *PCR Multiplex* incluindo os genes marcadores *lmo0737*, *lmo1118*, *ORF2819*, *ORF2110* e *prs* para a separação molecular dos quatro principais serotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b) (Doumith *et al.*, 2004). Os genes selecionados para o ensaio de *PCR Multiplex*, funcionam como marcadores facilitando a avaliação dos serotipos das estirpes de *L. monocytogenes*.

A amplificação dos genes marcadores permite a separação das estirpes em quatro PCR serogrupos. O PCR serogrupo IIa compreende os serotipos 1/2a e 3a (amplificação dos genes *prs* e *lmo0737*); O PCR serogrupo IIb contém os serotipos 1/2b, 3b e 7 (amplificação dos genes *prs* e *ORF2819*); O PCR serogrupo IIc abrange os serotipos 1 / 2c e 3c (amplificação dos genes *prs*, *lmo0737* e *lmo1118*); O PCR serogrupo IVb compreende os serotipos 4b, 4d e 4e (amplificação dos genes *prs*, *ORF2819* e *ORF2110*) (Doumith *et al.*, 2004) (Tabela 9).

**Tabela 9:** Genes marcadores amplificados em cada PCR serogrupo de *Listeria monocytogenes*.

Serotipos	PCR Serogrupos	Amplificação dos genes marcadores por <i>PCR Multiplex</i>				
		<i>lmo1118</i>	<i>lmo0737</i>	<i>ORF2110</i>	<i>ORF2819</i>	<i>prs</i>
1/2a, 3a	IIa	-	+	-	-	+
1/2b, 3b, 7	IIb	-	-	-	+	+
1/2c, 3c	IIc	+	+	-	-	+
4b, 4d, 4e	IVb	-	-	+	+	+
<i>Listeria spp.</i>		-	-	-	-	+

Fonte: Doumith *et al.*, (2004).

Doumith *et al.* (2004) propuseram assim uma alternativa à serotipagem clássica, em particular para a vigilância a longo prazo e como primeiro método de tipagem em investigações epidemiológicas.

#### 7.4. Whole genome sequencing (WGS)

Cada organismo tem uma sequência de DNA única que é composta pelas bases azotadas Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) e Guanina (G). A determinação da ordem das bases forma a sua sequência. Assim, a sequenciação do genoma inteiro - *whole genome sequencing* (WGS) é um procedimento laboratorial que determina a ordem das bases no genoma de um organismo.

A sequenciação do genoma inteiro (WGS) emergiu como uma poderosa tecnologia para a comparação de isolados na análise de surtos (Hyden *et al.*, 2016; Kwong *et al.*, 2016).

Kwong *et al.* (2016) avaliaram a utilização de WGS como ensaio de rotina e compararam com o uso de métodos de tipagem, incluindo PFGE, MLST, MLVA e serotipagem, para a vigilância epidemiológica de *Listeria monocytogenes*. Concluíram que a WGS tem a capacidade de ser superior às abordagens atuais recorrendo aos métodos de tipagem acima referidos podendo ser o futuro para a vigilância epidemiológica de *L. monocytogenes*.

De uma forma resumida, a WGS consiste em extrair o DNA da bactéria, sendo depois cortado com enzimas de restrição em pequenos fragmentos que são posteriormente amplificados por PCR. Em seguida é feita a sequenciação automática dos fragmentos amplificados tendo em conta a sua composição em A, T, C, G. Com a ajuda de um software específico é feita a leitura das sequências e o seu agrupamento de forma a conseguir ter a sequenciação do genoma inteiro.

Em 2013, o CDC começou a usar a WGS para investigar surtos causados por *L. monocytogenes*. Desde então, este método tem permitido aos cientistas detetar mais *clusters* de *L. monocytogenes*, resolver mais surtos de listeriose enquanto estes ainda são pequenos e associar casos clínicos a prováveis fontes alimentares de contaminação (CDC, 2017c).

Em 2015, no INSA, a evidência e investigação de um surto de listeriose com origem em géneros alimentícios prontos para consumo, foram complementadas através da sequenciação total do genoma dos isolados. A técnica de PFGE é cada vez menos utilizada nos Laboratórios de Referência a nível europeu, tendo vindo a ser substituída pela sequenciação total do genoma (WGS). A sua aplicação no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais permitiu em 2015 a confirmação laboratorial de um surto de listeriose (Silveira *et al.*, 2016).

A recente evolução das tecnologias WGS, tem permitido o desenvolvimento de metodologias de tipagem molecular de alta resolução para a caracterização de linhagens de *L. monocytogenes* (Ruppitsch *et al.*, 2015a; Pightling *et al.*, 2015; Kwong *et al.*, 2016; Maury *et al.*, 2016).

A tipagem de *L. monocytogenes* baseada em *core genome multilocus sequence typing* (cgMLST) representa uma expansão do método clássico 7geneMLST (Salcedo *et al.*, 2003) sendo superior em todos os aspetos nas investigações epidemiológicas quando comparada com os métodos atuais PFGE e AFLP (Schmid *et al.*, 2014; Ruppitsch *et al.*, 2015b). A sequenciação do genoma permite não só a caracterização numa resolução muito alta, como também facilita a extração rápida de dados específicos, tornando assim a tipagem por cgMLST bastante promissora como o novo “*Gold Standard*” para a caracterização rápida e precisa de *L. monocytogenes* (Kwong *et al.*, 2016). A tipagem por cgMLST é o método utilizado actualmente pelo Instituto Pasteur de Paris para caracterizar estirpes de *L. monocytogenes*.

Moura *et al.* (2016) aplicaram a metodologia cgMLST para um grande número de estirpes de *L. monocytogenes* de diferentes origens (a nível geográfico, temporal e epidemiológico). Este estudo permitiu decifrar a estrutura populacional e a taxa evolutiva de *L. monocytogenes*, demonstrar a transmissão internacional de estirpes de *L. monocytogenes* e desenvolver uma nomenclatura unificada baseada em genomas de estirpes de *L. monocytogenes*, acessível através de uma plataforma de bioinformática aberta, permitindo a colaboração internacional em pesquisa e vigilância de saúde pública com base na sequenciação do genoma de alto rendimento.

## 8. Introdução ao trabalho laboratorial

O trabalho prático em que se baseou a realização deste relatório de estágio teve lugar no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN), Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP. (INSA). Este laboratório desenvolve atividades nas áreas da segurança alimentar e toxicologia através de investigação e desenvolvimento, vigilância, referência, prestação de serviços diferenciados, formação, informação e consultoria.

Contribui para o desenvolvimento de planos de prevenção e controlo de doenças de origem alimentar, bem como assegura a recolha, compilação e transmissão de dados à Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), para efeitos de comunicação à Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA).

Perante uma suspeita de toxinfecção alimentar, o Laboratório de Microbiologia do DAN, realiza a pesquisa de microrganismos, tendo em atenção o tipo de alimento envolvido suspeito e os sintomas apresentados pelos doentes que consumiram o alimento em causa.

A realização do presente trabalho prático decorreu entre 12 de setembro de 2016 e 28 de fevereiro de 2017, na sequência da contaminação ocasional do produto final (queijo), com *Listeria monocytogenes*, proveniente de um cliente (queijaria) do Sul do país.

Desde 2011, o Laboratório de Microbiologia do DAN, tem vindo a monitorizar o produto final proveniente desta queijaria, tendo sido detetada ocasionalmente presença de *L. monocytogenes*.

Com o objetivo de investigar qual a origem da contaminação e, desta forma, contribuir para a erradicação do problema, o laboratório iniciou a investigação com o estudo da tipagem de *L. monocytogenes* utilizando o método PFGE, segundo o protocolo PulseNet. Foram estudadas no INSA, 77 culturas por PFGE, das quais 38 foram analisadas no período de estágio acima referido. As culturas de *L. monocytogenes* foram isoladas de superfícies da queijaria, de leite cru e do produto final (queijo).

Posteriormente, dado o problema de persistência de *L. monocytogenes* na queijaria, efetuou-se no INSA, o estudo da eficácia dos desinfetantes usados na queijaria num conjunto de culturas de *L. monocytogenes* previamente selecionadas. Para este estudo aplicou-se a Norma EN 1040/2005.

Além destas duas atividades práticas também se realizou na ESA/IPCB a serotipagem de um conjunto de isolados de *L. monocytogenes* previamente selecionados, através de um ensaio de *PCR Multiplex* desenvolvido no Instituto Pasteur de Paris por Doumith *et al.* (2004).

Como complemento deste trabalho prático, foram enviadas amostras para o Instituto Pasteur de Paris, para sequenciação por WGS e análise posterior para tipagem MLST e cgMLST.

## **9. Materiais e métodos**

### **9.1. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em superfícies**

Em outubro de 2016 foram efetuados 34 esfregaços a diferentes superfícies no interior da queijaria, usando quer zaragatoa quer esponja, de acordo com o procedimento interno DAN URMI-PE01L. Este procedimento está de acordo com a Norma ISO 18593:2004 e está de acordo com a *Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of Listeria monocytogenes*, de 2012.

Pretendeu-se efetuar uma análise a todas as salas da queijaria, desde a receção do leite cru até à expedição do queijo, com o intuito de verificar as possíveis vias de contaminação da queijaria por esta bactéria. Assim, do total de amostras colhidas, dezoito provieram de superfícies higienizadas e dezasseis de superfícies não higienizadas.

A distribuição dos pontos de colheita foram os seguintes: sala de receção do leite (n=1), sala de produção do queijo (n=21), câmaras de cura (n=5), sala de lavagem do queijo (n=4), sala de selagem (n=1) e sala de expedição (n=2).

Após chegada ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA, foi feita a pesquisa de *Listeria monocytogenes* usando o método VIDAS LMO2 (bioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, França), com confirmação dos resultados positivos segundo a Norma EN ISO 11290-1:1996, AMD 2004.

A partir de cada amostra com pesquisa positiva para *L. monocytogenes* foi purificada e conservada uma cultura para posterior serotipagem e tipagem molecular por PFGE.

## 9.2. Isolados bacterianos

Para além das culturas de *Listeria monocytogenes* isoladas no decurso deste trabalho a partir de esfregaços efetuados em outubro de 2016, foram igualmente usadas 68 culturas provenientes da mesma queijaria, de amostras analisadas entre 2011 e 2016. Estas culturas tiveram origem a partir de amostras de queijo de ovelha (n=54), leite cru de ovelha (n=9), esfregaços de mãos (n=3) e de superfícies (n=2).

Estas culturas encontravam-se criopreservados a -20 °C, em meio *Trypticase Soya Broth* (TSB) com 20% (v/v) de glicerol.

## 9.3 Tipagem por PFGE

A eletroforese de campo pulsado (PFGE) apresenta um elevado poder discriminatório e elevada taxa de reprodutibilidade.

As enzimas de macrorestrição *Ascl* e *Apal* possibilitaram a tipagem das 77 culturas de *Listeria monocytogenes*, em estudo. Para analisar as relações genéticas entre os 77 perfis obtidos com cada uma das enzimas foi utilizado o software BioNumerics (BioNumerics® - Version 3.5, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). A análise de clusters foi calculada pelo método Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) usando um coeficiente Dice e otimização ajustados a 0,5-1,5%, com uma tolerância de posição de 1,0-1,5 % para a comparação de bandas, tendo as bandas incertas sido ignoradas (Martin *et al.*, 2006).

A tipagem molecular por PFGE de todas as culturas de *L. monocytogenes* isoladas na queijaria entre 2011 e 2016 foi realizada segundo o “Standard Operating Procedure for PulseNet of *Listeria monocytogenes*, CDC\_PNL04\_abril2013”.

Do total de 77 culturas de *L. monocytogenes* usadas na tipagem molecular por PFGE, 38 foram tipadas no âmbito deste trabalho (Tabela 10) e as restantes 39 tinham sido previamente tipadas pelo Laboratório de Microbiologia do DAN.

Tabela 10: Culturas de *Listeria monocytogenes* com perfil *Ascl/Apal* desconhecido.

Referência	Origem	Data Isolamento
1	Queijo de ovelha curado	25-10-2011
2	Queijo de ovelha curado	14-02-2012
3	Queijo de ovelha curado	29-05-2012
4	Queijo de ovelha curado	29-05-2012
5	Queijo de ovelha curado	29-05-2012
6	Queijo de ovelha curado	29-05-2012
7	Queijo de ovelha curado	29-05-2012
8	Queijo de ovelha curado	11-06-2012
9	Queijo de ovelha curado	11-06-2012
10	Queijo de ovelha curado	11-06-2012
11	Queijo de ovelha curado	11-06-2012
12	Queijo de ovelha curado	03-09-2012
13	Queijo de ovelha curado	03-09-2012
14	Queijo de ovelha curado	03-09-2012
15	Queijo de ovelha curado	03-09-2012
16	Queijo de ovelha curado	03-09-2012
17	Queijo de ovelha curado	13-03-2013
18	Queijo de ovelha curado	08-05-2014
19	Leite cru de ovelha - prod. B	26-11-2015
20	Esfregaço - parede câmara 3	26-10-2016
21	Esfregaço - ralo câmara 3	26-10-2016
22	Esfregaço - escovas lavagem	26-10-2016
23	Esfregaço - cuba lavagem	26-10-2016
24	Esfregaço - ralo sala de lavagem	26-10-2016
25	Esfregaço - parede câmara 4	26-10-2016
26	Esfregaço - ralo câmara 4	26-10-2016
27	Esfregaço - paredes câmara 6	26-10-2016
28	Esfregaço - lava-mãos expedição	26-10-2016
29	Queijo de ovelha curado	28-07-2016
30	Queijo de ovelha curado	28-07-2016
31	Queijo de ovelha curado	28-07-2016
32	Queijo de ovelha curado	28-07-2016
33	Queijo de ovelha curado	28-07-2016
34	Queijo de ovelha curado	11-08-2016
35	Queijo de ovelha curado	11-08-2016
36	Queijo de ovelha curado	11-08-2016
37	Queijo de ovelha curado	11-08-2016
38	Queijo de ovelha curado	11-08-2016

### 9.3.1. Preparação das suspensões bacterianas

#### 9.3.1.1. *Listeria monocytogenes*

Repicaram-se as 38 culturas de *Listeria monocytogenes*, do meio *Trypticase Soya Broth* (TSB) com 20% glicerol, para o meio sólido *Agar Listeria* segundo Ottaviani & Agosti (ALOA) - COMPASS® *LISTERIA AGAR* (Biokar-Diagnostics, Pantin Cedex, França) e incubou-se a 37 °C durante 24-48 h para verificar a pureza das culturas. Em seguida, inoculou-se uma colónia isolada de *L. monocytogenes* em *Colombia Agar* com 5 % de sangue de carneiro (COS) (bioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, França), para verificar a capacidade hemolítica após incubação *overnight* (14-18h) a 37°C.

Com uma ansa de 10 µL, arrastou-se cultura da placa de COS, ressuspenderam-se as células em 2 mL de tampão TE (10 mM Tris: 1 mM EDTA, pH 8,0) em tubos estéreis (4 mL), de fundo redondo com tampa. Com pipeta de Pasteur transferiu-se a suspensão celular para uma cuvette de espectrofotómetro plástica, e acertou-se a absorvência ( $\lambda=610$  nm) a cerca de 1.00. Após o acerto, transferiu-se a suspensão para tubos *Eppendorf* de fundo redondo e manteve-se a suspensão no gelo.

#### 9.3.1.2 *Salmonella* Braenderup H9812

A estirpe utilizada como marcador é *Salmonella* Braenderup H9812, estando conservada da mesma forma que as culturas de *Listeria monocytogenes*, ou seja, em criotubos a -20 °C, em meio *Trypticase Soya Broth* (TSB) com 20% (v/v) de glicerol. Quando necessária, repicou-se a cultura de *S. Braenderup* para meio sólido *Tryptone Soya Agar* (TSA) (Biokar-Diagnostics, Pantin Cedex, França) e incubou-se *overnight* a 37 °C.

Com uma ansa de 10 µL, arrastou-se cultura da placa de TSA e ressuspenderam-se as células em 2 mL de solução TSB (100 mM Tris-HCL: 100 mM EDTA, pH 8,0), em tubos estéreis (4 mL), de fundo redondo com tampa. Com pipeta de Pasteur transferiu-se a suspensão celular para uma cuvette de espectrofotómetro e acertou-se a absorvência ( $\lambda=610$  nm) a cerca de 1.00. Após o acerto, transferiu-se a suspensão para tubos *Eppendorf* de fundo redondo e manteve-se a suspensão no gelo.

### 9.3.2. Preparação dos discos de agarose

#### 9.3.2.1. *Listeria monocytogenes*

Para a preparação dos discos de agarose foram usadas seringas de plástico de 1 mL, às quais se cortou a ponta, de forma a servir de molde aos discos. A cada seringa, correspondia uma amostra. Assim, cada seringa continha uma mistura de 400 µL de suspensão celular de *Listeria monocytogenes*, 20 µL de lisozima (Merck, Darmstadt, Alemanha) (20 mg/mL), 20 µL de Proteinase K (AppliChem, Darmstadt, Alemanha) (20 mg/mL) e 400 µL de solução de *Seakem Gold Agarose* (Lonza, Walkersville, EUA) a 1%, aquecida a 55 °C.

#### 9.3.2.2. *Salmonella* Braenderup H9812

Para a preparação dos discos de agarose, usou-se uma mistura de 400  $\mu\text{L}$  de suspensão celular de *S. Braenderup*, 20  $\mu\text{L}$  de Proteinase K (AppliChem, Darmstadt, Alemanha) (20 mg/mL) e 400  $\mu\text{L}$  de solução de *Seakem Gold Agarose* (Lonza, Walkersville, EUA) a 1%, aquecida a 55 °C.

Deixaram-se arrefecer as seringas com a extremidade cortada voltada para cima, até solidificar (5 min.), seguidamente colocaram-se em posição horizontal e levaram-se ao congelador (4 min.). Para terminar deixaram-se repousar na horizontal, à temperatura ambiente, durante 15 minutos.

#### 9.3.3. Corte dos discos e lise celular

Colocou-se cada seringa em cima de uma lâmina de vidro, com a ajuda de uma lamela, cortou-se o gel em fatias com cerca de 1,5 mm de espessura até obter cerca de 10 discos por seringa. Cinco discos, de cada amostra, foram colocados em tubos *Falcon* de 50 mL, previamente identificados, contendo 5 mL de solução de lise celular constituída por 5 mL de solução Tris EDTA-N-Lautilsarcosina (TES) e 25  $\mu\text{L}$  de Proteinase K (AppliChem, Darmstadt, Alemanha) (20 mg/mL). Incubaram-se depois os discos nos tubos *Falcon overnight* em banho de água a 54-55 °C com agitação de 150-175 rpm.

#### 9.3.4. Lavagens

Após o período de lise celular, os discos foram transferidos para seringas de 20 mL (sem embolo) previamente identificadas e submetidos a lavagens.

Efetuaram-se duas lavagens, colocando 10 mL de água ultra pura estéril obtida pelo sistema de purificação de água Milli-Q Advantage A10 (Millipore, Massachusetts, EUA), aquecida a 50°C, na seringa contendo os discos, durante 10-15 min cada, no banho a 50°C com agitação. Seguidamente, realizaram-se quatro lavagens, colocando 10 mL de tampão TE, aquecido a 50°C na seringa contendo os discos, durante 10-15 min, no banho com água a 50°C e com agitação. Rejeitou-se o tampão TE e, com a ajuda de uma ansa de 10  $\mu\text{L}$ , retiraram-se os discos para um novo tubo *Falcon* (15 mL), previamente identificado, contendo 5 mL de tampão TE. Guardaram-se os tubos a 4 °C até serem usados.

### 9.3.5. Digestão do DNA com enzimas de restrição

#### 9.3.5.1. *Listeria monocytogenes*

Primeiramente, foi efetuada uma pré-restrição com os tampões de equilíbrio das enzimas de restrição *Ascl* e *Apal* (Thermo Scientific, Vilnius, Lituânia).

Para isso, na câmara de segurança biológica, mediu-se 180  $\mu\text{L}$  de água bidestilada estéril (B Braun, Queluz de Baixo, Portugal) para um tubo *Eppendorf* de 2 mL, de fundo redondo e adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  do tampão de enzima, perfazendo um volume total de 200  $\mu\text{L}$ . Procedeu-se da mesma forma tanto para o tampão da enzima *Ascl* (Buffer Tango) (Thermo Scientific, Vilnius, Lituânia) como da *Apal* (Buffer B) (Thermo Scientific, Vilnius, Lituânia).

Com a ajuda de uma ansa de 10  $\mu\text{L}$ , retirou-se um disco de cada amostra do tubo *Falcon* (15 mL) e mergulhou-se no tampão de equilíbrio de cada enzima. Incubaram-se as amostras a digerir com *Ascl* na estufa a 37 °C e as amostras a digerir com *Apal* na estufa a 25 °C, durante 5-10 minutos.

Após este período de incubação, aspirou-se, com o auxílio da micropipeta, o tampão de equilíbrio, sem danificar o disco. Em seguida, retirou-se cada disco para o *Eppendorf* contendo a solução de restrição correspondente a cada enzima de restrição (Tabela 11) e incubaram-se as amostras a digerir com *Ascl* na estufa a 37 °C e as amostras a digerir com *Apal* na estufa a 25 °C, durante 3 horas.

Tabela 11: Componentes da solução de restrição para as enzimas *Ascl*, *XbaI* e *Apal*.

Solução de restrição	Quantidade por amostra digerida por <i>Ascl/XbaI</i> ( $\mu\text{L}$ )	Quantidade por amostra digerida por <i>Apal</i> ( $\mu\text{L}$ )
Água bidestilada estéril (B Braun, Queluz de Baixo, Portugal)	177,5	179,0
Tampão de enzima (Thermo Scientific, Vilnius, Lituânia)	20,0	20,0
Enzima	2,5=25 Unit.	1,0=50 Unit.

Fonte: Protocolo "Standard Operating Procedure for PulseNet of *Listeria monocytogenes*, CDC\_PNL04\_abril2013, página 11.

#### 9.3.5.2. *Salmonella Braenderup* H9812

A pré-restrição do marcador foi realizada da mesma forma que as amostras de *Listeria monocytogenes*. Contudo, o tampão de equilíbrio utilizado é igual para as enzimas *Ascl* e *XbaI* (Buffer Tango) (Thermo Scientific, Vilnius, Lituânia) incubando-se igualmente a 37 °C, durante 5-10 minutos.

Após este período de incubação, aspirou-se, com o auxílio da micropipeta, o tampão de equilíbrio, sem danificar o disco. Em seguida, retirou-se cada disco para o *Eppendorf* contendo a solução de restrição correspondente à enzima *XbaI* (Tabela 11) e incubaram-se as amostras na estufa a 37 °C, durante 3 horas.

### 9.3.6. Eletroforese de campo pulsado

#### 9.3.6.1. Preparação e carregamento do gel de agarose

Primeiramente, preparou-se cerca de 4 litros de tampão de eletroforese (TBE 0,5x), em frascos *SCHOTT* de 1 L. Guardaram-se três frascos a 4 °C e um frasco à temperatura ambiente.

Em seguida, preparou-se o gel de PFGE. Pesou-se cerca de 1 g de *Seakem Gold Agarose* (Lonza, Walkersville, EUA) e adicionou-se a 100 mL de TBE 0,5x num frasco *SCHOTT* (500 mL). Aqueceu-se a solução no micro-ondas a 620 W durante 60 segundos, repetindo-se o procedimento de 15 em 15 segundos até dissolver totalmente. Colocou-se o frasco com a agarose fundida em banho de água a 55-60 °C, durante 15 minutos. Após arrefecimento, verteu-se a agarose para o berço e guardou-se cerca de 6-10 mL no banho de água, para lacrar os poços. A agarose colocada no berço polimerizou durante cerca de 45 minutos.

Após o tempo de polimerização, retirou-se o pente de 15 poços. Com o auxílio de uma ansa descartável de 10 µL retirou-se um disco, previamente emergido em 200 µL de TBE 0,5x, e com a ajuda de uma lamela fez-se deslizar o disco para dentro do respetivo poço.

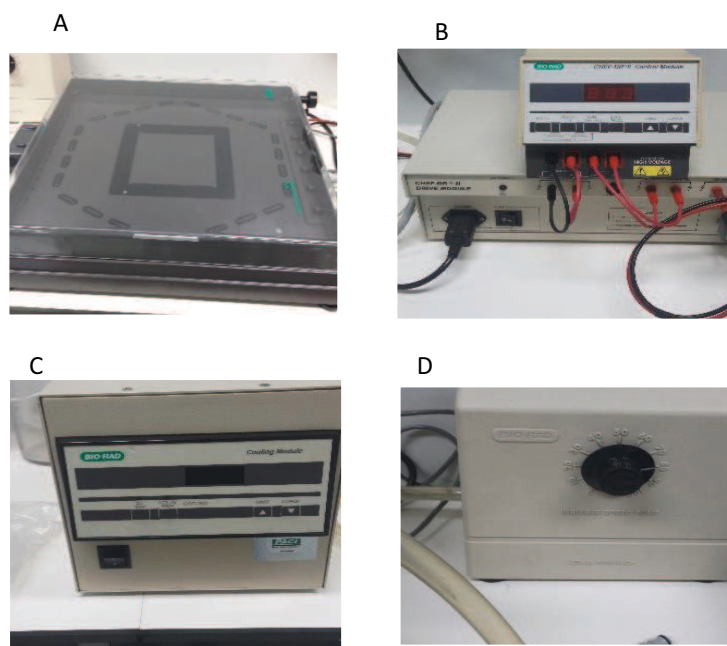
Organizou-se sempre o gel de forma a colocar três discos marcadores (um em cada extremidade do gel e outro ao centro), de forma a facilitar a leitura e posterior tratamento dos resultados. Após colocação dos discos, lacraram-se os poços com a agarose guardada no banho de água a 55-60 °C, desenformou-se o gel e colocou-se o mesmo na tina de eletroforese.

#### 9.3.6.2. Programação do equipamento de PFGE

Enquanto o gel polimerizava era preparado o equipamento PFGE composto pela tina de eletroforese (*Electrophoresis Cell*, BioRad™) (Figura 8-A), o equipamento *CHEF Mapper* (CHEF-DR® II Drive Module, BioRad™) (Figura 8-B) e o refrigerador (*Cooling module*, BioRad™) (Figura 8-C). Colocou-se cerca de 0,5 L de tampão TBE 0,5x na tina de eletroforese e ligou-se a bomba (*Variable Speed Pump*, BioRad™) (Figura 8-D), durante 5 minutos, de forma a lavar o sistema.

Após a lavagem do sistema, retirou-se o tampão de lavagem e verteu-se 2,5 L de novo TBE 0,5x a 4 °C, para a tina de PFGE, ligou-se o refrigerador e programou-se para 14 °C. De seguida ligou-se a bomba a 80 L/min de forma a circular o tampão e atingir a temperatura programada no refrigerador.

Aquando da colocação do gel carregado no centro da tina, programou-se o equipamento *CHEF Mapper* da seguinte forma: voltagem 6 V/cm, tempo de impulso inicial 4,0 segundos, tempo de impulso final 40,0 segundos e tempo de corrida 19 horas. Após verificação de toda as variantes da programação, era dado início à corrida.



**Figura 8:** Equipamentos utilizados na técnica de tipagem por PFGE. A: Eletrophoresis cell, B: “CHEF Mapper”, C: Colling Module, D: Variable Speed Pump.

Fonte própria.

### 9.3.7. Coloração e revelação do gel

Após o tempo de corrida, retirou-se o gel da tina e colocou-se num tabuleiro contendo uma solução de *GelRed™* (Biotium, Fremont, EUA), durante 25 minutos com agitação.

A revelação do gel foi feita num transiluminador UV (BioRad™) e a foto do gel foi visualizada no sistema Gel Doc 2000 e guardada em formato *TIFF*. Na Figura 9 pode ser visualizado um exemplo de imagem obtida por PFGE.

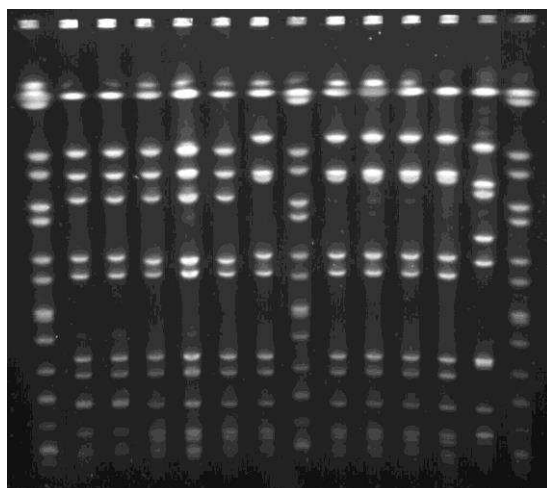


Figura 9: Exemplo de fotografia de gel, obtida por PFGE.

Fonte própria.

### 9.3.8. Tratamento dos dados da tipagem por PFGE

A análise e comparação dos resultados (fotos dos géis) obtidos por PFGE, foi realizada no software BioNumerics (BioNumerics® - Version 3.5, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

As bandas atribuídas automaticamente pelo software foram verificadas visualmente e corrigidas manualmente quando necessário. Para cada enzima de restrição foi selecionada uma tolerância da posição da banda de 1,2. A análise das similaridades entre as várias culturas isoladas da queijaria foi feita usando o coeficiente de Dice, com uma tolerância de posição de 1%, e o algorítmico *Unweighted pair group with arithmetic means* (UPGMA).

## 9.4. Serotipagem por PCR Multiplex

Este ensaio foi realizado no Laboratório de Microbiologia e no Laboratório de Biologia da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

O método aplicado consiste num ensaio *PCR Multiplex*, o qual permite a separação dos quatro serotipos mais prevalentes (1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b) de *Listeria monocytogenes*. O método apresentado é baseado em Doumith *et al.* (2004), com algumas modificações (Pintado e Goulão, 2011).

### 9.4.1. Culturas bacterianas

Tendo em conta que à data de realização da serotipagem já era conhecido o pulsotipo de todas as culturas sujeitas a tipagem por PFGE, foi efetuada uma seleção de apenas 31 culturas para serotipagem por *PCR Multiplex*. Como critério de seleção foi escolhida uma cultura por ano de isolamento, por origem e por pulsotipo.

Com base no critério anteriormente definido, foram selecionadas para a serotipagem as culturas com as referências 1, 2, 3, 8, 12, 17, 18, 19, 20, 21, 29, 30, 33, 34, 38, 39, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 52, 55, 57, 58, 62, 66, 70, 73 e 74.

#### 9.4.2. Extração de DNA

A partir de colônias em meio sólido TSA, recolheu-se, com uma ansa descartável de 1  $\mu\text{L}$ , três a cinco colônias para um tubo *Eppendorf*, onde previamente tinha sido colocado 50  $\mu\text{L}$  de uma solução a 0,25% de dodecil sulfato de sódio em 0,05 N de NaOH estéril, colocou-se o microtubo em banho de água a 99 °C, durante 15 minutos. Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de água ultra pura estéril (Gibco®, Life technologies™, Paisley, Inglaterra) e homogeneizou-se. Após a extração de DNA das culturas de *L. monocytogenes* em estudo, procedeu-se à amplificação do DNA.

#### 9.4.3. Amplificação do DNA por PCR Multiplex

Em tubos de 0,2 mL de *PuReTaq Ready-to-Go PCR Beads* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) colocou-se 1,5  $\mu\text{L}$  de DNA, 2,5  $\mu\text{L}$  do *primer prs 2*  $\mu\text{M}$  *Forward* (For.) e *Reverse* (Rev.), 2,5  $\mu\text{L}$  do *primer Imo1118* 15  $\mu\text{M}$  (For. e Rev.), 2,5  $\mu\text{L}$  do *primer Imo0737* 10  $\mu\text{M}$  (For. e Rev.), 2,5  $\mu\text{L}$  do *primer ORF2819* 10  $\mu\text{M}$  (For. e Rev.), 2,5  $\mu\text{L}$  do *primer ORF2110* 10  $\mu\text{M}$  (For. e Rev.) e 11  $\mu\text{L}$  de água ultrapura (Gibco®, Life technologies™, Paisley, Inglaterra). Cada *PuReTaq Ready-to-Go PCR Beads* contém estabilizantes, BSA, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, ~ 2,5 unidades de pureTaq DNA polimerase e tampão de reação.

Submeteu-se a mistura obtida a um processo de desnaturação inicial a 94 °C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos sucessivos com a sequência seguinte: 0,40 minutos a 94 °C para a desnaturação, 1,15 minutos a 53 °C para a ligação dos *primers* e 1,15 minutos a 72 °C para a amplificação. Seguiu-se um ciclo final de 7 minutos a 72 °C. Por último, deu-se o arrefecimento a 4 °C. A amplificação foi realizada num termociclador Tgradiente (Biometra, Göttingen, Alemanha) e teve a duração de 2 horas, 28 minutos e 12 segundos.

#### 9.4.4. Separação dos fragmentos de DNA por eletroforese convencional

A separação dos produtos do PCR do DNA de cada uma das amostras foi realizada por eletroforese em gel de agarose (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha) a 2%. Após a preparação, o gel foi vertido no tabuleiro da tina de eletroforese (BioRad™ Wide mini subcell GT) na qual se colocou previamente o pente adequado (15 poços).

Carregaram-se as amostras no gel, de acordo com a seguinte sequência: no primeiro poço, no poço do meio e no último poço colocou-se 8  $\mu\text{L}$  de marcador (100 bp DNA Ladder, Introgen, Vilnius, Lituânia), previamente preparado com *gel loading*. Nos restantes poços colocou-se 5  $\mu\text{L}$  da mistura constituída pela amostra de DNA amplificado adicionada de 3  $\mu\text{L}$  de solução de deposição, *gel loading buffer* (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), destinando-se esta a conferir peso à amostra, mantendo-a dentro do poço do gel.

A corrida de eletroforese realizou-se na tina de eletroforese acima referida, contendo tampão TAE 1x (Gibco®, Life technologies™, Paisley, Inglaterra), durante 1 hora e 45 minutos a 90 V.

#### **9.4.5. Coloração e revelação do gel de agarose**

Após término da corrida de eletroforese, o gel de agarose foi colocado num banho com brometo de etídio, durante 20 minutos. Observou-se posteriormente o gel por transiluminação UV e fotografou-se com uma câmara digital (*Kodack DC 290*), devidamente adaptada, tendo as imagens sido guardadas em formato *TIFF*.

### **9.5. Whole genome sequencing (WGS)**

Em janeiro de 2017 as 77 culturas de *Listeria monocytogenes* usadas neste estudo foram enviadas para o Instituto Pasteur de Paris para caracterização molecular. Todas as estirpes enviadas foram sujeitas à tipagem por *PCR Multiplex* e a um conjunto selecionado de oito destas estirpes (referências 1, 18, 25, 28, 44, 51, 71 e 76) foi efetuada a sequenciação total do genoma (WGS), sendo posteriormente analisado tendo em conta a determinação dos tipos MLST e cgMLST. A metodologia de sequenciação utilizada foi baseada em Moura *et al.* (2016).

### **9.6. Avaliação da atividade bactericida dos desinfetantes químicos**

Para a realização da avaliação acima referida, teve-se como referência o protocolo descrito pela Norma EN 1040/2005, relativa à avaliação da atividade bactericida dos desinfetantes químicos e antissépticos através de um teste de suspensão quantitativa.

#### **9.6.1 Princípio do teste**

Uma amostra do desinfetante, tal qual como fornecido (concentração máxima: 80%) e/ou diluído em água, é adicionado a uma suspensão bacteriana teste. A mistura é mantida a  $20 \pm 1$  °C durante 5 min  $\pm$  10 seg. (condições teste obrigatórias).

No final do tempo de contacto, é retirada uma alíquota e a atividade bactericida e/ou bacteriostática nessa porção é imediatamente neutralizada pelo método de diluição/neutralização. O número de bactérias sobreviventes em cada amostra é determinado e a redução da carga bacteriana é calculada.

### 9.6.2. Culturas usadas no ensaio

Neste estudo, pretendeu-se avaliar a atividade bactericida de quatro desinfetantes utilizados e disponibilizados pela queijaria (Tabela 12). Para a realização deste ensaio selecionou-se pelo menos uma cultura por pulstotipo, por tipo de amostra e por ano de isolamento. Com base nos critérios anteriormente definidos, foram selecionadas para este estudo as culturas com as referências 1, 2, 3, 4, 8, 12, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 33, 34, 35, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 57, 61, 65, 66, 67, 70, 71, 73, 74, 75, 76 e 77. No total avaliou-se a atividade bactericida dos desinfetantes em 52 culturas de *Listeria monocytogenes*.

Para se obter a cultura de trabalho das bactérias teste, repicou-se uma ansa de cada cultura a partir do meio TSB com 20% glicerol, conservado a - 20 °C, para o meio sólido TSA e incubou-se a 37 °C durante 24 horas. Após o período de incubação, preparou-se uma segunda subcultura a partir da primeira subcultura, da mesma forma. A partir desta segunda subcultura, preparou-se uma terceira seguindo o mesmo procedimento. A segunda e, quando necessário, a terceira subculturas foram as culturas de trabalho.

A validação do método foi realizada com as estirpes de referência indicadas na Norma EN 1040/2005, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662 e *Staphylococcus aureus* NCTC 10788, e com uma estirpe de *L. monocytogenes* ATCC 13932 de forma a validar o método para *L. monocytogenes*.

Tabela 12: Características dos produtos (detergentes/desinfetantes) testados.

Produto	Substância biocida	Instruções de aplicação	Zona de aplicação	Frequência de aplicação
I	Peróxido de hidrogénio e ácido peracético	1. Aplicar numa concentração de 2-3%. 2. Durante 10 a 30 minutos. 3. Enxaguar com água fria e potável.	Sala fabrico Sala receção leite	Semanal
II	Halogénios (hipoclorito de sódio)	1. Aplicar numa concentração de 2-5% com água à temperatura máxima de 70 °C. 2. Deixar 15 a 20 minutos. 3. Enxaguar com água de preferência quente.	Câmaras de cura Sala expedição Sala fabrico Sala receção leite Sala lavagem	Diário
III	Compostos quaternários de amónia	1. Esfregar os objetos mergulhados numa solução a 2%. 2. Esperar 15 minutos. 3. Enxaguamento final com água de qualidade potável.	Sala fabrico Sala receção leite	Diário
IV	Compostos quaternários de amónia, halogénios (digluconato de clorexidina)	Higiene das mãos.	Sala fabrico Sala lavagem Sala expedição	Diário

### 9.6.3. Soluções dos desinfetantes em teste

As soluções teste dos produtos desinfetantes foram preparadas com água destilada esterilizada, num mínimo de três concentrações diferentes. Sendo um requisito da Norma EN 1040/2005, a concentração mais alta testada foi 80%, seguida de 5 e 2% por serem as concentrações recomendadas pelos fornecedores dos desinfetantes I, III e o detergente/desinfetante II.

O detergente/desinfetante IV, sendo um desinfetante de mãos é utilizado tal e qual, sem recurso a diluições. Por isso a concentração mais alta testada foi 100%, seguida de 80% pelo requisito acima enumerado e 70% para completar o mínimo de três concentrações exigidas pela norma. Como todos os produtos testados eram líquidos, foram preparadas diluições em água, volume/volume, usando frascos volumétricos.

As soluções teste foram preparadas na hora e usadas num prazo máximo de duas horas. Todas as soluções apresentavam uma homogeneidade física que permaneceu estável durante todo o procedimento.

### 9.6.4. Soluções dos neutralizantes testados

Para a seleção do neutralizante a usar nos testes de diluição/neutralização, foram testados três neutralizantes (Tabela 13).

Tabela 13: Esquema da composição química dos neutralizantes testados.

Composição	Neutralizantes		
	A	B	C
Tampão fosfato	0,25 mol/L		
Tween 80		30 g/L	
L-Histidina		1 g/L	
Tiosulfato de Sódio			5 g/L

Para preparar o neutralizante A pesou-se 34 g de dihidrogénio-fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e colocou-se num frasco SCHOTT com 500 mL água destilada esterilizada. Ajustou-se o pH ( $7,2 \pm 0,2$ ) com hidróxido de sódio (NaOH) 1M e perpez-se com água até 1000 mL.

A preparação do neutralizante B consistiu em pesar 30 g de Tween 80 (polisorbato 80) e 1 g de L-Histidina. Colocou-se a dissolver num copo de vidro com 500 mL água destilada esterilizada. Ajustou-se o pH ( $7,2 \pm 0,2$ ) com hidróxido de sódio (NaOH) 1M e perpez-se com água até 1 000 mL.

O neutralizante C preparou-se pesando 5 g de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) num copo de vidro e adicionou-se em seguida 500 mL água destilada esterilizada. Ajustou-se o pH ( $7,2 \pm 0,2$ ) com hidróxido de sódio (NaOH) 1M e perpez-se com água até 1 000 mL.

Todos os neutralizantes foram esterilizados em autoclave por ação do calor húmido, durante 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ .

#### **9.6.5. Condições experimentais**

A temperatura utilizada em todos os testes foi a temperatura obrigatória da Norma EN 1040/2005, ou seja,  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Os tempos de contacto utilizados em todos os testes foi o tempo de contacto obrigatório da norma acima referida, ou seja, 5 minutos  $\pm$  5 segundos e o tempo médio de atuação descrito pelos fornecedores dos detergentes/desinfetantes testados que foi de 15 minutos  $\pm$  5 segundos.

#### **9.6.6. Suspensões teste “N”**

Para cada microrganismo testado foram preparadas duas suspensões diferentes: a “suspensão teste” para efetuar o teste e a “suspensão de validação” para efetuar os controlos e a validação do método.

Assim, para preparar a “suspensão teste” colocou-se 10 mL do diluente Triptona Sal (Biokar, Cedex, França) num frasco de 100 mL com 5 g de esferas de vidro. Transferiu-se com uma ansa de  $10\ \mu\text{L}$ , cultura de trabalho para o diluente. As células foram suspensas, friccionando a ansa contra a parede do frasco para libertar as células antes de as imergir no diluente. Agitou-se o frasco durante 3 minutos usando um agitador tipo Vortex. Transferiu-se a suspensão (sem as esferas de vidro) para outro tubo. Ajustou-se o número de células na suspensão até um valor dentro do intervalo  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL a  $5 \times 10^8$  UFC/mL, usando o aparelho Densimat (BioMérieux, Marcy-l’Etoile, França). Em seguida, colocou-se a suspensão teste no banho de água a  $20^\circ\text{C}$ . Para efetuar a contagem prepararam-se diluições de  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  das suspensões teste, usando o diluente. Retirou-se uma alíquota de 1,0 mL de cada diluição em duplicado e inoculou-se usando a técnica de sementeira por incorporação, em placas de Petri separadas e previamente identificadas, adicionando 15 a 20 mL de TSA fundido e arrefecido a  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ . Incubou-se e efetuou-se a contagem (de acordo com a alínea 9.6.12).

#### **9.6.7. Suspensão de validação “Nv”**

Para preparar a suspensão de validação, diluiu-se a suspensão teste com o diluente até obter um valor entre  $3,0 \times 10^2$  UFC/mL e  $1,6 \times 10^3$  UFC/mL (cerca de  $\frac{1}{4}$  (1+3) da diluição  $10^{-5}$ ).

Para a contagem, preparou-se uma diluição de  $10^{-1}$  da qual se retirou uma alíquota de 1,0 mL em duplicado e inoculou-se usando a técnica de sementeira por incorporação. Incubou-se e efetuou-se a contagem (de acordo com a alínea 9.6.12).

#### **9.6.8. Controlo “A” (Validação das condições experimentais)**

Pipetou-se 1,0 mL de água destilada esterilizada para o tubo de ensaio esterelizados, adicionou-se 1,0 mL da suspensão teste, colocou-se o tubo no banho de água a 20 °C e iniciou-se imediatamente a cronometragem, durante 2 minutos  $\pm$  10 segundos. No final do tempo de contacto (t), retirou-se uma alíquota de 1,0 mL da mistura “A” em duplicado, inoculou-se usando a técnica de sementeira descrita na alínea anterior. Incubou-se e efetuaram-se as contagens (de acordo com a alínea 9.6.12).

#### **9.6.9. Controlo “B” (Verificação da ausência de toxicidade do neutralizante)**

Pipetou-se 8,0 mL do neutralizante e 1,0 mL de água destilada esterilizada para o tubo de ensaio esterelizado, em seguida adicionou-se 1,0 mL da suspensão de validação. Iniciou-se a cronometragem no início da adição, misturando e colocando o tubo no banho de água a  $20 \pm 1$  °C durante 5 minutos  $\pm$  10 segundos. Por fim, retirou-se uma alíquota de 1,0 mL da mistura “B” em duplicado e inoculou-se recorrendo à técnica de sementeira por incorporação descrita na alínea 9.6.4. Incubou-se e efetuaram-se as contagens (de acordo com a alínea 9.6.12).

#### **9.6.10. Controlo “C” (Validação da diluição-neutralização)**

Para um tubo de ensaio esterilizado, pipetou-se 1,0 mL da água destilada esterilizada e adicionou-se 1,0 mL do diluente Triptona Sal. Deu-se início à cronometragem, adicionando-se 8,0 mL da solução teste do produto na concentração mais elevada usada no teste. Agitou-se e colocou-se o tubo no banho de água a  $20 \pm 1$  °C. No final dos 5 min  $\pm$  10 segundos, transferiu-se 1,0 mL da mistura para um tubo contendo 8,0 mL de neutralizante. Iniciou-se a cronometragem imediatamente, agitou-se e colocou-se o tubo no banho a  $20 \pm 1$  °C durante 5 min  $\pm$  10 segundos.

Após a reação do neutralizante com a solução teste do produto em estudo, adicionou-se 1,0 mL da suspensão teste e agitou-se. Colocou-se o tubo no banho de água à temperatura descrita anteriormente durante  $30 \pm 1$  min. No final do tempo, retirou-se 1,0 mL da mistura “C”, em duplicado, e inoculou-se usando a técnica de sementeira por incorporação. Incubou-se e efetuaram-se as contagens (de acordo com a alínea 9.6.12).

### 9.6.11. Teste “*Na*” (Determinação da concentração bactericida)

Num tubo de ensaio esterilizado, pipetou-se 1,0 mL da água destilada esterilizada, adicionou-se 1,0 mL de suspensão teste, homogeneizou-se e deu-se início à cronometragem, 2 min  $\pm$  10 s no banho de água a 20  $\pm$  1°C. Em seguida, adicionou-se 8,0 mL da solução teste do produto nas respetivas concentrações usadas no teste. Agitou-se e colocou-se o tubo no banho de água a 20  $\pm$  1°C.

No final do tempo de contacto em estudo, transferiu-se 1,0 mL da mistura para um tubo de ensaio contendo 8,0 mL de neutralizante. Iniciou-se a cronometragem imediatamente, agitou-se e colocou-se o tubo no banho a 20  $\pm$  1 °C durante o tempo de contacto em estudo. No final do tempo, retirou-se 1.0 mL da mistura “*Na*”, em duplicado, e inoculou-se usando a técnica de sementeira por incorporação. Incubou-se e efetuaram-se as contagens (de acordo com a alínea 9.6.12).

### 9.6.12. Incubação e contagem

As placas de Petri inoculadas por incorporação foram todas incubadas durante 24+24 horas a 37  $\pm$  1 °C. Rejeitaram-se sempre as placas incontáveis às primeiras 24 h, assumindo sempre as contagens obtidas no segundo período de 24 horas de incubação.

Os limites para a contagem de colónias bacterianas em placas de Petri são 15 e 300 (limites mínimo e máximo, respetivamente). De acordo com a Norma EN 1040/2005, o desvio aceitável é 10%, portanto, o limite mínimo de contagem considerado foi 14 e o limite máximo foi 330.

#### 9.6.12.1. Determinação dos valores *Vc*

O valor *Vc* corresponde ao número de UFC contáveis em 1 mL de amostra.

Quando a contagem de colónias foi superior a 330, registou-se o número como “>330”; quando o valor *Vc* foi inferior a 14, registou-se a contagem, mas substituiu-se por “<14” para calcular o *Na*).

Primeiro determinaram-se os valores *Vc*, seguidamente calcularam-se *N*, *N0*, *Na*, *Nv*, *Nv0*, *A*, *B* e *C*. Por fim, calculou-se a redução *R*.

#### 9.6.12.2. Cálculo do $N$ e $N0$

$N$  corresponde ao número de células por mL na suspensão teste. Após validação de duas diluições da suspensão teste, calculou-se o número de UFC/mL como média ponderada das contagens, usando a seguinte equação:

$$N = \frac{c}{(n_1 + 0,1n_2)10^{-6}}$$

onde,

$C$  é o somatório dos valores das contagens  $Vc$ ;

$n1$  é o número de placas com contagens  $Vc$  da menor diluição ( $10^{-6}$ );

$n2$  é o número de placas com contagens  $Vc$  da maior diluição ( $10^{-7}$ );

$10^{-6}$  é o fator de diluição correspondente à menor diluição.

Os resultados obtidos foram arredondados a dois algarismos significativos. Assim, o número de UFC/mL foi expresso num valor numérico entre 1,0 e 9,9 multiplicado pela potência de base 10 e expoente apropriado.

#### 9.6.12.3. Cálculo de $Na$

$Na$  é o número de sobreviventes por mL na mistura teste no final do tempo de contacto e antes da neutralização. É dez vezes superior ao valor  $Vc$ , devido à adição do neutralizante e da água.

Calculou-se  $Na$  usando a seguinte equação:

$$N = \frac{10c}{n}$$

onde,

$c$  é o somatório dos valores da contagem  $Vc$ ;

$n$  é o número de valores da contagem  $Vc$ .

#### 9.6.12.4. Cálculo de $Nv$ e $Nv0$

$Nv$  corresponde ao número de células por mL na suspensão de validação. É dez vezes maior que as contagens dos valores  $Vc$  devido ao passo de diluição de  $10^{-1}$ .

$Nv0$  é o número de células por mL nas misturas B e C no início do tempo de contacto. Corresponde a um décimo ( $1/10$ ) da média ponderada dos valores  $Vc$  do  $Nv$ .

As equações para o cálculo de  $Nv$  e  $Nv0$  são as seguintes:

$$Nv = \frac{10c}{n} \qquad Nv0 = \frac{c}{n}$$

sendo,

$c$  o somatório dos valores da contagem  $Vc$ ;

$n$  o número de valores da contagem  $Vc$ .

#### 9.6.12.5. Cálculo de $A$ , $B$ e $C$

O cálculo de  $A$ ,  $B$  e  $C$  foi realizado segundo a seguinte equação:

$$A, B, C = \frac{C}{n}$$

onde,

$c$  é o somatório dos valores da contagem  $Vc$ ;

$n$  é o número de valores da contagem  $Vc$ .

#### 9.6.12.6. Cálculo da redução bacteriana “ $R$ ”

A redução bacteriana ( $R = N_0/Na$ ) é expressa em logaritmo.

Para cada cultura bacteriana, registou-se o número de UFC/mL na suspensão teste  $N$  e no teste  $Na$  e calculou-se  $N_0$ .

Para cada concentração de produto e condição experimental, calculou-se e registou-se a redução logarítmica decimal (lg), separadamente, usando a equação:

$$Lg R = Lg N_0 - Lg Na$$

## 10. Resultados e Discussão

### 10.1. Resultados da pesquisa de *Listeria monocytogenes* em superfícies da queijaria

Os resultados da pesquisa de *Listeria monocytogenes* nas 34 superfícies da queijaria, efetuadas em outubro de 2016, encontram-se nas Tabelas 14 e 15.

Tabela 14: Resultados da pesquisa de *Listeria monocytogenes* aos esfregaços efetuados à sala de receção do leite e sala de produção da queijaria, em 2016.

Descrição da superfície	Ponto de colheita	Método	Superfície	Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i>
Bilha de transporte do leite	Sala receção do leite	Esponja	Higienizada	Negativo
Interior da cuba 1 de coagulação do leite	Sala de produção	Esponja	Higienizada	Negativo
Interior da cuba 3 de coagulação do leite	Sala de produção	Esponja	Higienizada	Negativo
Bocal da cuba 1	Sala de produção	Zaragatoa	Higienizada	Negativo
Bocal da cuba 2	Sala de produção	Zaragatoa	Higienizada	Negativo
Interior da cuba 2 de coagulação do leite	Sala de produção	Esponja	Higienizada	Negativo
Bocal da cuba 3	Sala de produção	Zaragatoa	Higienizada	Negativo
Ralo pequeno	Sala de produção	Zaragatoa	Não higienizada	Negativo
Ralo grande	Sala de produção	Zaragatoa	Não higienizada	Negativo
Bocal da mangueira	Sala de produção	Zaragatoa	Não higienizada	Negativo
Cinchos de inox com tampa de plástico	Sala de produção	Zaragatoa	Higienizada	Negativo
Cinchos de inox	Sala de produção	Zaragatoa	Higienizada	Negativo
Tampas (de plástico) dos cinchos	Sala de produção	Zaragatoa	Higienizada	Negativo
Rede plástica de um dos tabuleiros	Sala de produção	Zaragatoa	Higienizada	Negativo
Tabuleiros de plástico	Sala de produção	Zaragatoa	Higienizada	Negativo
Lava mãos - válvula 5	Sala de produção	Esponja	Não higienizada	Negativo
Enchedora de cinchos	Sala de produção	Esponja	Higienizada	Negativo
Pás que auxiliam no enchimento dos cinchos	Sala de produção	Esponja	Higienizada	Negativo
Molde do requeijão	Sala de produção	Zaragatoa	Higienizada	Negativo
Molde do queijo fresco	Sala de produção	Zaragatoa	Higienizada	Negativo
Panela do requeijão	Sala de produção	Esponja	Não higienizada	Negativo
Pia de lavagem de utensílios - válvula 6	Sala de produção	Esponja	Não higienizada	Negativo

**Tabela 15:** Resultados da pesquisa de *Listeria monocytogenes* aos esfregaços efetuados nas câmaras de cura, na sala de lavagem do queijo, na sala de selagem e na sala de expedição da queijaria, em 2016.

Descrição da superfície	Ponto de colheita	Método	Superfície	Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i>
<b>Paredes da câmara 3</b>	Câmara 3	Esponja	Não higienizada	Positivo
<b>Ralo da câmara 3</b>	Câmara 3	Zaragatoa	Não higienizada	Positivo
<b>Escovas de lavagem dos queijos</b>	Sala lavagem queijo	Zaragatoa	Não Higienizada	Positivo
<b>Interior da cuba de lavagem dos queijos</b>	Sala lavagem queijo	Esponja	Não higienizada	Positivo
<b>Lava mãos - válvula 12</b>	Sala lavagem queijo	Esponja	Não higienizada	Negativo
<b>Ralo da sala de lavagem dos queijos</b>	Sala lavagem queijo	Zaragatoa	Não higienizada	Positivo
<b>Paredes da câmara 4</b>	Câmara 4	Esponja	Não higienizada	Positivo
<b>Ralo da câmara 4</b>	Câmara 4	Zaragatoa	Não higienizada	Positivo
<b>Paredes da câmara 6</b>	Câmara 6	Esponja	Não higienizada	Positivo
<b>Bancada de selagem do queijo fresco</b>	Sala de selagem	Esponja	Higienizada	Negativo
<b>Lava mãos da sala de expedição</b>	Sala de expedição	Esponja	Não higienizada	Positivo
<b>Sola das botas de um dos colaboradores</b>	Sala de expedição	Zaragatoa	Não higienizada	Negativo

Os resultados mostraram que 0,0% das 17 superfícies higienizadas e 53,0% das 17 superfícies não higienizadas apresentaram presença de *L. monocytogenes*. No global 26,5% das 34 superfícies analisadas apresentaram resultados positivos para pesquisa de *L. monocytogenes*.

Considerando as 9 superfícies onde foi detetada a bactéria *L. monocytogenes*, todas correspondiam a superfícies não higienizadas existentes nas câmaras 3, 4 e 6, na sala de lavagem do queijo, nas escovas de lavagem do queijo e na sala de expedição. As câmaras 3 e 4 são destinadas à cura de queijos de pasta mole fabricados com leite cru de ovelha, enquanto a câmara 6 é destinada à conservação de queijo fresco e requeijão de ovelha. Apenas os queijos de leite cru de ovelha são lavados na sala de lavagem com as escovas, nas quais foi detetada a presença de *L. monocytogenes*. Na sala de expedição é efetuada a rotulagem e embalamento de todos os alimentos produzidos pela queijaria.

Spanu *et al.* (2015) estudaram a prevalência de *L. monocytogenes* e outras *Listeria* spp. em treze indústrias de queijo de ovelha na ilha italiana da Sardenha, e obtiveram pesquisa positiva para *L. monocytogenes* em 44,5% das amostras obtidas (n=409). Entre as amostras positivas para *L. monocytogenes*, a maioria (n=109) das amostras foi isolada dos ralos.

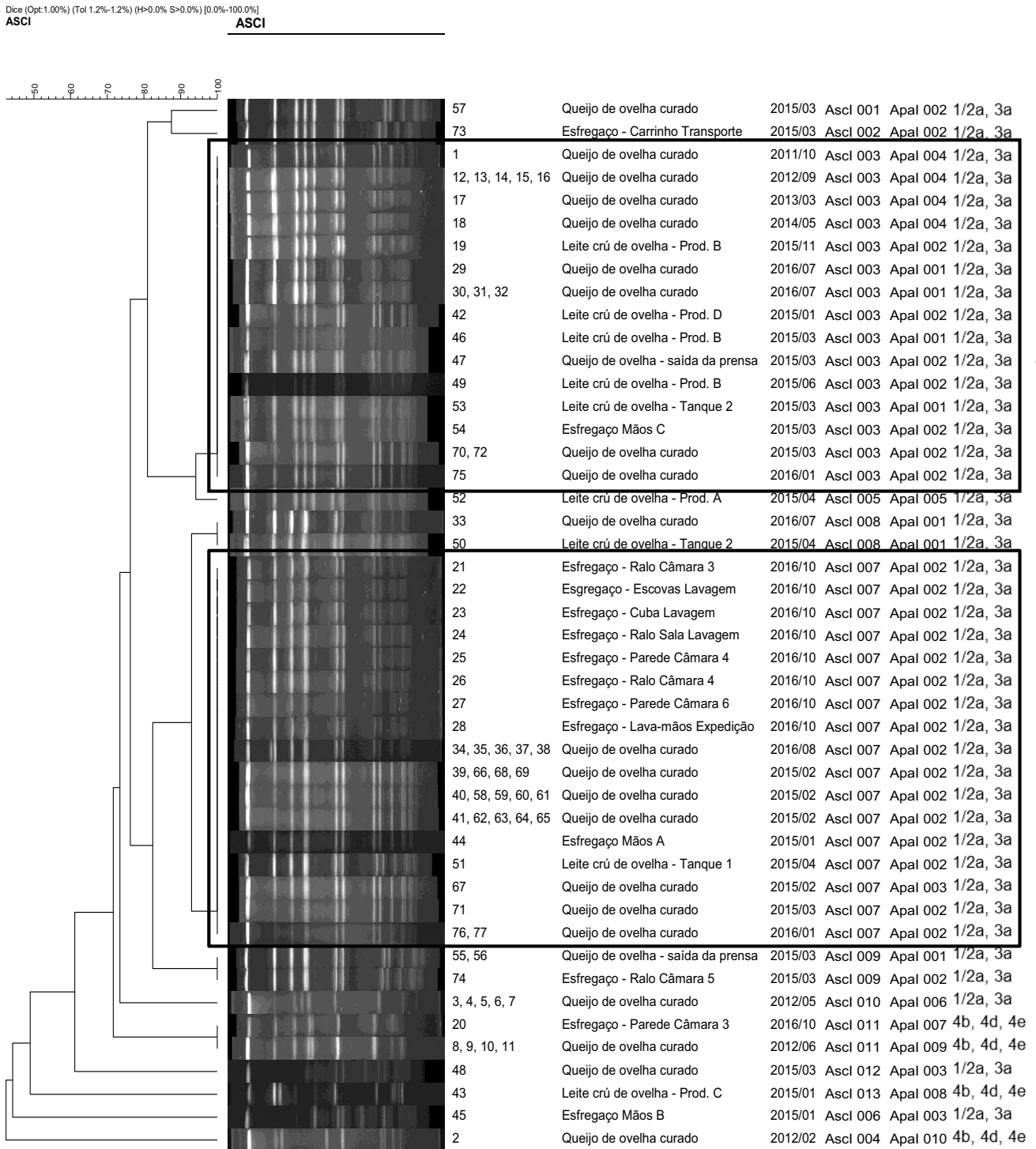
No nosso estudo, cerca de 14,7% dos esfregaços realizados às superfícies da queijaria correspondem a ralos (n=5), sendo que 71,0% desses ralos evidenciaram resultados positivos para pesquisa de *L. monocytogenes*.

Atendendo à totalidade de esfregaços que apresentaram resultado positivo para pesquisa de *L. monocytogenes*, 33,3% corresponderam a esfregaços realizados em ralos, 33,3% corresponderam a paredes de câmaras de cura do queijo, 22,2% a esfregaços realizados na sala de lavagem do queijo e 11,2% ao esfregaço realizado na sala de expedição.

Da análise dos resultados positivos para a pesquisa de *L. monocytogenes* nas superfícies da queijaria, consegue-se perceber que existe uma relação entre a sala/câmara e o respetivo ralo. Isto é, foi detetada *L. monocytogenes* nas paredes da câmara 3 e ralo da câmara 3, o mesmo se passou para a câmara 4 e a sala de lavagem dos queijos, evidenciando a persistência desta bactéria nas instalações da queijaria.

## 10.2. PFGE

As Figuras 10 e 11 mostram os dendrogramas de todas as culturas com base na digestão com as enzimas de macrorestrição *Ascl* e *Apal*, respetivamente.



**Figura 10:** Dendrograma (UPGMA cluster baseado no coeficiente de correlação) dos perfis PFGE de 77 culturas de *Listeria monocytogenes*, digeridas com *Ascl*. O BioNumerics versão 3.5 foi utilizado com otimização de 1,0 % e tolerância 1,2 % para a comparação de bandas. Encontram-se indicados a referência dos isolados, bem como a origem, a data de isolamento, o perfil *Ascl*, o perfil *Apal* e o serogrupo de cada cultura. a- Isolados com perfil *Ascl* 003, b- Isolados com perfil *Ascl* 007.

Atendendo à Figura 10, é possível verificar a similaridade entre os perfis *Ascl*. Assim, o perfil *Ascl* 001 e *Ascl* 002 têm 87,51% de similaridade; os perfis *Ascl* 003 e *Ascl* 005, 94,12%; *Ascl* 008 e *Ascl* 007, 92,95% entre si e 82,41% com *Ascl* 009. Estes sete perfis apresentam 76,26 % de similaridade com o perfil *Ascl* 010. Estes 8 perfis *Ascl* são similares em 73,43% com os restantes.

Analisando o dendrograma respeitante à enzima de restrição *Ascl* (Figura 10), é possível observar que os perfis *Ascl* 003 e *Ascl* 007 se destacam por representarem 71,4% do total de culturas de *L. monocytogenes* sujeitas a tipagem por PFGE (55 de um total de 77). De entre os dois perfis, o *Ascl* 007 foi identificado em 33 culturas (42,8%) e o perfil *Ascl* 003 foi identificado em 22 culturas (28,6%).

O perfil *Ascl* 003 corresponde a isolados de queijo de ovelha curado (n=15), queijo à saída da prensa (n=1), leite cru de ovelha (n=5) e esfregaço de mãos (n=1), sendo este um perfil de *L. monocytogenes* persistente durante os anos 2011-2016. De facto, é possível encontrar este perfil em isolados de queijo obtidos nos anos 2011 (n=1), 2012 (n=5), 2013 (n=1), 2014 (n=1), 2015 (n=3) e 2016 (n=5). Para além do queijo, também se obteve este perfil de leite proveniente de dois produtores de leite cru de ovelha e de leite cru do tanque, no ano 2015, e ainda de esfregaço às mãos de um operador da queijaria, também no ano de 2015.

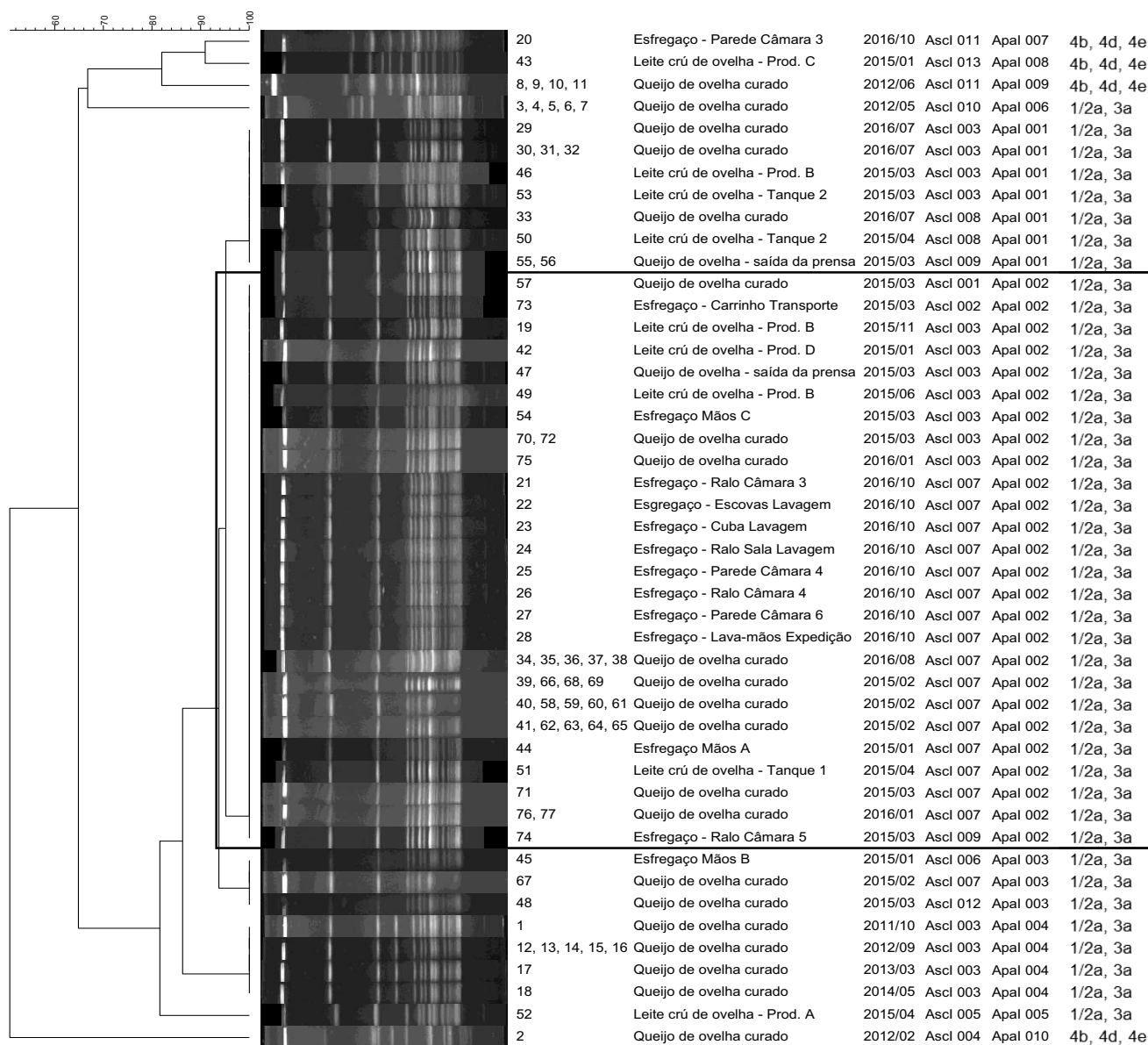
Com o perfil *Ascl* 007 existem isolados de esfregaços de superfície (n=8), queijo de ovelha curado (n=23), leite cru de ovelha (n=1) e esfregaços de mãos (n=1), sendo o perfil mais recorrente nos anos 2015 e 2016.

Na Figura 11 é possível observar a similaridade entre os perfis obtidos por PFGE após digestão do DNA com a enzima de restrição *Apal*. Verifica-se que os perfis *Apal* 001 e *Apal* 002 são os mais representativos e apresentam uma similaridade entre si de 95,15%. Já o perfil *Apal* 003 é similar em 93,74% com os anteriores. Os perfis *Apal* 001, *Apal* 002, *Apal* 003, *Apal* 004 e *Apal* 005 apresentam similaridade entre si de 86,26%.

Como referido anteriormente, os perfis *Apal* 001 e *Apal* 002 destacam-se no dendrograma apresentado na Figura 11 por serem os perfis associados a 68,8% das culturas de *L. monocytogenes* tipadas por PFGE. Em particular, o perfil *Apal* 002 identificou-se em 55,8% dos 77 isolados de *L. monocytogenes*.

O perfil *Apal* 001 representa isolados de queijo de ovelha curado (n=5), queijo de ovelha à saída da prensa (n=2), leite cru de ovelha do produtor B e do tanque 2 (n=3). O perfil *Apal* 002 corresponde a isolados de queijo de ovelha curado (n=26), queijo de ovelha à saída da prensa (n=1), leite cru de ovelha (n=4), esfregaços de superfícies (n=10) e esfregaços de mãos (n=2). Ambos os perfis persistiram durante os anos 2015 e 2016 e estão associados apenas a isolados obtidos nos anos 2015 e 2016.

Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.2%-1.2%) (H=0.0% S=0.0%) [0.0%-100.0%]  
**APAI** **APAI**



**Figura 11:** Dendrograma (UPGMA cluster baseado no coeficiente de correlação) dos perfis PFGE de 77 culturas de *Listeria monocytogenes*, digeridos com *Apal*. O BioNumerics versão 3.5 foi utilizado com otimização de 1,0% e tolerância 1,2% para a comparação de bandas. Encontram-se indicados a referência dos isolados, bem como a origem, a data de isolamento, o perfil *Ascl*, o perfil *Apal* e o serogrupo de cada isolado.

A análise das duas figuras permite concluir que, da aplicação da enzima de restrição *Ascl* às 77 culturas de *L. monocytogenes*, resultaram 13 diferentes pulsotipos e da aplicação da enzima *Apal* resultaram 10 diferentes pulsotipos.

A Tabela 16, evidencia a disposição cronológica (2011-2016) dos perfis *Ascl* e *Apal* das 77 culturas de *L. monocytogenes* tendo em conta o ano de isolamento (2011, 2012, 2013, 2014, 2015 e 2016), o tipo de amostra (Q-queijo, L-leite ou S-superfície) e o número de isolados com cada um dos perfis *Ascl*/*Apal*.

Podemos verificar, que foi possível discriminar 18 diferentes perfis *Ascl*/*Apal*. Destes 18 pulsotipos obtidos, os perfis *Ascl* 003/*Apal* 002 e *Ascl* 007/*Apal* 002 são comuns a isolados provenientes de queijo, leite e superfícies.

**Tabela 16:** Distribuição dos perfis *Ascl* / *Apal* das 77 culturas de *Listeria monocytogenes* tendo em conta o ano de isolamento (2011, 2012, 2013, 2014, 2015 e 2016), o tipo de amostra (Q-queijo, L-leite ou S-superfície) e o número de isolados com esse perfil (número a seguir ao ano).

	<i>Apal</i> 001	<i>Apal</i> 002	<i>Apal</i> 003	<i>Apal</i> 004	<i>Apal</i> 005	<i>Apal</i> 006	<i>Apal</i> 007	<i>Apal</i> 008	<i>Apal</i> 009	<i>Apal</i> 010	TOTAL
<i>Ascl</i> 001		Q-2015-1									1
<i>Ascl</i> 002		S-2015-1									1
<i>Ascl</i> 003	L-2015-2 Q-2016-4	L-2015-3 Q-2015-3 S-2015-1 Q-2016-1		Q-2011-1 Q-2012-5 Q-2013-1 Q-2014-1							22
<i>Ascl</i> 004										Q-2012-1	1
<i>Ascl</i> 005					L-2015-1						1
<i>Ascl</i> 006			S-2015-1								1
<i>Ascl</i> 007		L-2015-1 Q-2015-15 S-2015-1 Q-2016-7 S-2016-8	Q-2015-1								33
<i>Ascl</i> 008	L-2015-1 Q-2016-1										2
<i>Ascl</i> 009	Q-2015-2	S-2015-1									3
<i>Ascl</i> 010							Q-2012-5				5
<i>Ascl</i> 011							S-2016-1		Q-2012-4		5
<i>Ascl</i> 012			Q-2015-1								1
<i>Ascl</i> 013								L-2015-1			1
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	<b>43</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>77</b>

Durante os anos de 2011-2014, o pulsotipo mais persistente foi *Ascl* 003/*Apal* 004. Os isolados que apresentam este pulsotipo, neste período, têm origem em queijo de ovelha curado. Contudo, entre 2011 e 2014, não se analisaram amostras de leite cru provenientes dos produtores, ficando por esclarecer o foco da contaminação. Verificase também que 12 dos 18 pulsotipos estão associados a apenas um ou dois isolados.

No ano 2015, verificou-se que os pulsotipos dominantes foram *Ascl* 003/*Apal* 002, *Ascl* 003/*Apal* 001 e *Ascl* 007/*Apal* 002. As culturas de *L. monocytogenes* com pulsotipo *Ascl* 003/*Apal* 002 foram isoladas de queijo de ovelha curado (n=1), queijo de ovelha à saída da prensa (n=1), leite cru de ovelha (n=3) sendo um isolado do produtor D e dois do produtor C e de esfregaços de mãos (n=1).

O leite cru pode ser uma fonte de introdução de *L. monocytogenes* na indústria (Waak *et al.*, 2002), tal como se verifica neste caso, embora sendo curioso o leite provir de dois produtores distintos. Segundo Schoder *et al.*, (2011) a presença de *L. monocytogenes* é mais provável em explorações que forneceram forragem durante todo o ano do que em explorações que não o fizeram, podendo esta ser a razão da contaminação do leite cru, pois o isolamento da estirpe de *L. monocytogenes* com este pulsotipo ocorreu em dois períodos distanciados no mesmo ano (principio e fim do ano) que são relativos ao Inverno onde as pastagens são escassas e os produtores têm que recorrer a luzerna (*Medicago sativa*) e palha para alimentar os animais.

Isolados de *L. monocytogenes* com o pulsotipo *Ascl* 003/ *Apal* 001, tiveram origem em queijo de ovelha curado (n=4), em leite cru de ovelha do produtor B (n=1) e em leite do tanque 2 (n=1). O pulsotipo *Ascl* 007/ *Apal* 002, foi isolado de queijo de ovelha curado (n=15), leite cru de ovelha (n=1) e esfregaços de mãos (n=1).

Em 2016, isolou-se *L. monocytogenes* com pulsotipo *Ascl* 003/ *Apal* 001, de dois queijos de ovelha curado. Foram isolados, nesse mesmo ano, queijos de ovelha curados (n=7) e esfregaços de superfície (n=8) com o pulsotipo *Ascl* 007/ *Apal* 002.

Tendo sido isoladas culturas de *L. monocytogenes* com pulsotipo *Ascl* 007/ *Apal* 002 de esfregaços de superfície (n=8), esfregaços de mãos (n=1), leite cru de ovelha (n=1) e queijos de ovelha curados (n=22), confirma-se a entrada da bactéria na queijaria através do leite cru (Waak *et al.*, 2002), o que originou uma contaminação ambiental (Rocourt e Cossart, 1997; Swaminathan, 2001) nas instalações da queijaria, que persiste desde o ano 2015, contabilizando assim 2 anos de contaminação com estirpes desse pulsotipo, confirmando a persistência de *L. monocytogenes* em queijarias durante longos períodos (Pintado *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2013; Senczek *et al.*, 2000; Spanu *et al.*, 2015).

### 10.3. Serotipagem por *PCR Multiplex*

Atendendo a que o método de tipagem por PFGE tem elevado poder discriminatório (Almeida *et al.*, 2013; Felix *et al.*, 2012; Graves e Swaminathan, 2001), considerou-se que o mesmo pulsotipo apresenta o mesmo serotipo (Figuras 10 e 11, Tabelas 19, 20 e 21), tal como se confirma com os resultados da serotipagem por *PCR Multiplex*, obtidos pelo Instituto Pasteur de Paris, para o total das 77 amostras de *Listeria monocytogenes*.

Na Figura 12 encontra-se um exemplo de imagem obtida neste trabalho, onde é possível identificar o PCR serogrupo IIa (1/2a, 3a), associado às culturas de *L. monocytogenes* com as referências 1, 3, 12, 17, 18, 19 e o PCR serogrupo IVb (4b, 4d, 4e), associado às culturas de *L. monocytogenes* com as referências 2 e 8.



**Figura 12:** Imagem obtida após amplificação e separação eletroforética dos genes marcadores e de 8 produtos *PCR Multiplex* de DNA isolados de queijo de ovelha curado (1 a 18) e leite cru de ovelha (19). As estirpes de *L. monocytogenes* A, B, C e D foram usadas como referência e correspondem, respetivamente, ao PCR serogrupo IIa (serotipos 1/2a, 3a), ao PCR serogrupo IVb (serotipos 4b, 4d, 4e), ao PCR serogrupo IIb (serotipos 1/2b, 3b, 7) e ao PCR serogrupo IIc (serotipos 1/2c, 3c).

As Tabelas 17, 18 e 19 mostram a disposição do resultado da serotipagem por *PCR Multiplex* obtido para as estirpes de *L. monocytogenes* isoladas em 2011-2014, 2015 e 2016, respetivamente.

**Tabela 17:** Descrição cronológica dos isolados de *Listeria monocytogenes*, a sua origem, os seus perfis *Ascl* e *Apal*, e o respetivo PCR serogrupo nos anos 2011-2014.

Referência	Origem	Data Isolamento	Perfil <i>Ascl</i>	Perfil <i>Apal</i>	PCR Serogrupo
1	Queijo de ovelha curado	25-10-2011	<i>Ascl</i> 003	<i>Apal</i> 004	IIa
2	Queijo de ovelha curado	14-02-2012	<i>Ascl</i> 004	<i>Apal</i> 010	IVb
3, 4, 5, 6, 7	Queijo de ovelha curado	29-05-2012	<i>Ascl</i> 010	<i>Apal</i> 006	IIa
8, 9, 10, 11	Queijo de ovelha curado	11-06-2012	<i>Ascl</i> 011	<i>Apal</i> 009	IVb
12, 13, 14, 15, 16	Queijo de ovelha curado	03-09-2012	<i>Ascl</i> 003	<i>Apal</i> 004	IIa
17	Queijo de ovelha curado	13-03-2013	<i>Ascl</i> 003	<i>Apal</i> 004	IIa
18	Queijo de ovelha curado	08-05-2014	<i>Ascl</i> 003	<i>Apal</i> 004	IIa

Analisando a Tabela 17, verifica-se que durante o período 2011-2014, os isolados de *L. monocytogenes* apresentam o PCR serogrupo IIa (contendo os serotipos 1/2a, 3a) (n=13) e o PCR serogrupo IVb (contendo os serotipos 4b, 4d, 4e) (n=5), tendo todas a mesma origem: queijo de ovelha curado. Os isolados com PCR serogrupo IVb, datam de 2012 (n=5), apresentando pulsotipos específicos: *Ascl* 004/ *Apal* 010 e *Ascl* 011/ *Apal* 009.

Contudo, não se isolou *L. monocytogenes* de leite cru nem de amostras ambientais, ficando assim por explicar o foco da contaminação do produto final da queijaria, no período 2011-2014, como anteriormente referido.

**Tabela 18:** Descrição cronológica dos isolados de *Listeria monocytogenes*, a sua origem, os seus perfis *Ascl* e *Apal* e o respetivo PCR serogrupo, no ano 2015.

Referência	Origem	Data Isolamento	Perfil <i>Ascl</i>	Perfil <i>Apal</i>	PCR Serogrupo
44	Esfregação mãos A	09-01-2015	<i>Ascl</i> 007	<i>Apal</i> 002	Ila
45	Esfregação mãos B	09-01-2015	<i>Ascl</i> 006	<i>Apal</i> 003	Ila
42	Leite cru de ovelha - prod. D	20-01-2015	<i>Ascl</i> 003	<i>Apal</i> 002	Ila
43	Leite cru de ovelha - prod. C	20-01-2015	<i>Ascl</i> 013	<i>Apal</i> 008	IVb
39, 66, 68, 69	Queijo de ovelha curado	12-02-2015	<i>Ascl</i> 007	<i>Apal</i> 002	Ila
40, 58, 59, 60, 61	Queijo de ovelha curado	12-02-2015	<i>Ascl</i> 007	<i>Apal</i> 002	Ila
41, 62, 63, 64, 65	Queijo de ovelha curado	12-02-2015	<i>Ascl</i> 007	<i>Apal</i> 002	Ila
67	Queijo de ovelha curado	12-02-2015	<i>Ascl</i> 007	<i>Apal</i> 003	Ila
48	Queijo de ovelha curado	02-03-2015	<i>Ascl</i> 012	<i>Apal</i> 003	Ila
57	Queijo de ovelha curado	02-03-2015	<i>Ascl</i> 001	<i>Apal</i> 002	Ila
70, 72	Queijo de ovelha curado	02-03-2015	<i>Ascl</i> 003	<i>Apal</i> 002	Ila
71	Queijo de ovelha curado	02-03-2015	<i>Ascl</i> 007	<i>Apal</i> 002	Ila
46	Leite cru de ovelha - prod. B	12-03-2015	<i>Ascl</i> 003	<i>Apal</i> 001	Ila
47	Queijo de ovelha - saída da prensa	12-03-2015	<i>Ascl</i> 003	<i>Apal</i> 002	Ila
55, 56	Queijo de ovelha - saída da prensa	12-03-2015	<i>Ascl</i> 009	<i>Apal</i> 001	Ila
54	Esfregação mãos C	17-03-2015	<i>Ascl</i> 003	<i>Apal</i> 002	Ila
73	Esfregação - carrinho transporte	17-03-2015	<i>Ascl</i> 002	<i>Apal</i> 002	Ila
74	Esfregação - ralo câmara 5	17-03-2015	<i>Ascl</i> 009	<i>Apal</i> 002	Ila
53	Leite cru de ovelha - tanque 2	26-03-2015	<i>Ascl</i> 003	<i>Apal</i> 001	Ila
50	Leite cru de ovelha - tanque 2	09-04-2015	<i>Ascl</i> 008	<i>Apal</i> 001	Ila
51	Leite cru de ovelha - tanque 1	09-04-2015	<i>Ascl</i> 007	<i>Apal</i> 002	Ila
52	Leite cru de ovelha - prod. A	09-04-2015	<i>Ascl</i> 005	<i>Apal</i> 005	Ila
49	Leite cru de ovelha - prod. B	09-06-2015	<i>Ascl</i> 003	<i>Apal</i> 002	Ila
19	Leite cru de ovelha - prod. B	26-11-2015	<i>Ascl</i> 003	<i>Apal</i> 002	Ila

Os isolados de *L. monocytogenes* que datam de 2015 (Tabela 18), apresentaram PCR serogrupo Ila (n=35) e IVb (n=1). Foram identificados 12 pulsotipos com PCR serogrupo Ila nas estirpes de *L. monocytogenes* isoladas em 2015, sendo os pulsotipos *Ascl* 007/ *Apal* 002 (n=15), *Ascl* 003/ *Apal* 002 (n=7) e *Ascl* 003/ *Apal* 001 (n=2) os mais representativos. O pulsotipo *Ascl* 013/ *Apal* 008 é único e corresponde a um isolado de *L. monocytogenes* com PCR serogrupo IVb.

**Tabela 19:** Descrição cronológica dos isolados de *Listeria monocytogenes*, a sua origem, os seus perfis *Ascl* e *Apal*, e o respetivo PCR serogrupo, no ano 2016.

Referência	Origem	Data Isolamento	Perfil <i>Ascl</i>	Perfil <i>Apal</i>	PCR Serogrupo
75	Queijo de ovelha curado	28-01-2016	<i>Ascl</i> 003	<i>Apal</i> 002	Ila
76, 77	Queijo de ovelha curado	28-01-2016	<i>Ascl</i> 007	<i>Apal</i> 002	Ila
29	Queijo de ovelha curado	28-07-2016	<i>Ascl</i> 003	<i>Apal</i> 001	Ila
30, 31, 32	Queijo de ovelha curado	28-07-2016	<i>Ascl</i> 003	<i>Apal</i> 001	Ila
33	Queijo de ovelha curado	28-07-2016	<i>Ascl</i> 008	<i>Apal</i> 001	Ila
34, 35, 36, 37, 38	Queijo de ovelha curado	11-08-2016	<i>Ascl</i> 007	<i>Apal</i> 002	Ila
20	Esfregaço - Parede Câmara 3	26-10-2016	<i>Ascl</i> 011	<i>Apal</i> 007	IVb
21	Esfregaço - Ralo Câmara 3	26-10-2016	<i>Ascl</i> 007	<i>Apal</i> 002	Ila
22	Esfregaço - Escovas Lavagem	26-10-2016	<i>Ascl</i> 007	<i>Apal</i> 002	Ila
23	Esfregaço - Cuba Lavagem	26-10-2016	<i>Ascl</i> 007	<i>Apal</i> 002	Ila
24	Esfregaço - Ralo Sala de Lavagem	26-10-2016	<i>Ascl</i> 007	<i>Apal</i> 002	Ila
25	Esfregaço - Parede Câmara 4	26-10-2016	<i>Ascl</i> 007	<i>Apal</i> 002	Ila
26	Esfregaço - Ralo Câmara 4	26-10-2016	<i>Ascl</i> 007	<i>Apal</i> 002	Ila
27	Esfregaço - Paredes Câmara 6	26-10-2016	<i>Ascl</i> 007	<i>Apal</i> 002	Ila
28	Esfregaço - Lava-Mãos Expedição	26-10-2016	<i>Ascl</i> 007	<i>Apal</i> 002	Ila

As estirpes de *L. monocytogenes* isoladas em 2016 (Tabela 19), apresentam PCR serogrupo Ila (n=21) e IVb (n=1). Isolados de *L. monocytogenes* com PCR serogrupo Ila, correspondem a 4 pulsotipos diferentes, *Ascl* 003/ *Apal* 001 (n=2), *Ascl* 003/ *Apal* 002 (n=1), *Ascl* 007/ *Apal* 002 (n=15), *Ascl* 008/ *Apal* 001 (n=1). O isolado com PCR serogrupo IVb apresenta pulsotipo *Ascl* 011/ *Apal* 007.

A presença do pulsotipo *Ascl* 011/ *Apal* 007 com PCR serogrupo IVb nas paredes da câmara 3 representa um risco ao nível da cura de queijos de ovelha nesta câmara de refrigeração uma vez que podem ocorrer contaminações cruzadas que culminam na contaminação do queijo de ovelha curado, pondo em causa a saúde pública.

Atendendo às Tabelas 18 e 19, verifica-se que o pulsotipo *Ascl* 007/ *Apal* 002, persistiu na queijaria durante 2015-2016, completando 2 anos de contaminação por *L. monocytogenes*. Assim, determinou-se que dos 77 isolados de *L. monocytogenes* 5,2% (n=4) das culturas apresentam PCR serogrupo IVb e as restantes 94,8% (n=73) apresentam o PCR serogrupo Ila. Os isolados com PCR serogrupo IVb, datam de 2012 (n=2), 2015 (n=1) e 2016 (n=1), apresentando pulsotipos específicos: *Ascl* 004/ *Apal* 010, *Ascl* 011/ *Apal* 009, *Ascl* 013/ *Apal* 008 e *Ascl* 011/ *Apal* 007.

Estudos filogenéticos revelaram que *L. monocytogenes* apresenta quatro linhagens filogenéticas (I-IV), constituídas por serotipos específicos. A linhagem I é constituída pelos serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e, e 7 (Haase *et al.*, 2014) na qual se insere o serogrupo 4b, 4d, 4e. Assim, pode concluir-se que 9,1% das culturas de *L. monocytogenes* pertencem à linhagem I. As restantes culturas de *L. monocytogenes* pertencem ao serogrupo 1/2a, 3a, inserindo-se na linhagem II (serotipos 1/2a, 1/2c, 3a, e 3c) (Haase *et al.*, 2014). Cerca de 96% dos surtos de listeriose reportados são causados por estirpes com linhagem I e II (serotipos 4b, 1/2a, 1/2b) (Doumith *et al.*, 2004), indicando que todas as estirpes de *L. monocytogenes* estudadas podem originar listeriose.

#### 10.4. Whole genome sequencing (WGS)

Foi efetuada a serotipagem por *PCR Multiplex* às 77 estirpes de *Listeria monocytogenes*.

Os resultados da sequenciação mostraram que as oito estirpes de *L. monocytogenes* pertencem ao complexo clonal CC7 (cgMLST) e ao tipo ST7 (MLST). Foram identificados quatro tipos cgMLST entre as oito estirpes: CT2915, CT2916, CT2917, CT2918, como se verifica na Tabela 20.

**Tabela 20:** Relação das três metodologias de tipagem molecular efetuadas a oito estirpes de *Listeria monocytogenes*.

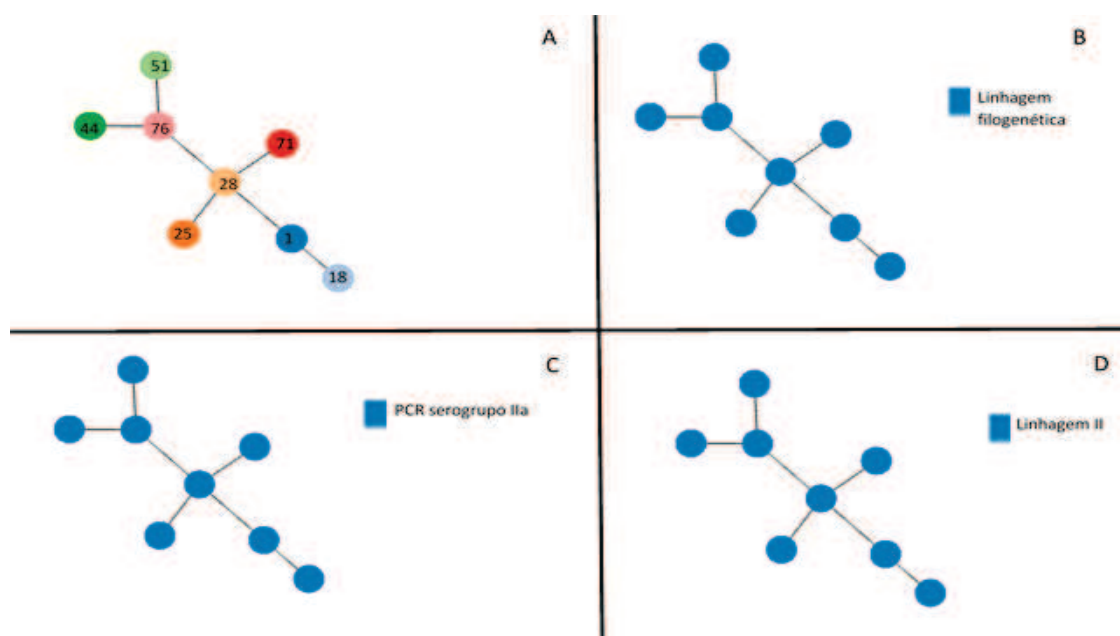
Referência	Amostra		Tipagem molecular			Resultados sequenciação do genoma				
	Origem	Data de Isolamento	PFGE	CC (MLST)	PCR Serogrupo	ST (MLST)	Linhagem	CT (cgMLST)	SL (cgMLST)	alelos cgMLST não identificados
25	Esfregação - parede câmara 4	26/10/2016	<i>Ascl</i> 007/ <i>Apal</i> 002	CC7	Ila	ST7	II	CT2915	SL7	13
28	Esfregação - lava-mãos expedição	26/10/2016	<i>Ascl</i> 007/ <i>Apal</i> 002	CC7	Ila	ST7	II	CT2915	SL7	9
44	Esfregação mãos A	09/01/2015	<i>Ascl</i> 007/ <i>Apal</i> 002	CC7	Ila	ST7	II	CT2915	SL7	13
71	Queijo de ovelha curado	02/03/2015	<i>Ascl</i> 007/ <i>Apal</i> 002	CC7	Ila	ST7	II	CT2915	SL7	31
76	Queijo de ovelha curado	08/01/2015	<i>Ascl</i> 007/ <i>Apal</i> 002	CC7	Ila	ST7	II	CT2915	SL7	7
51	Leite cru de ovelha - tanque 1	09/04/2015	<i>Ascl</i> 007/ <i>Apal</i> 002	CC7	Ila	ST7	II	CT2916	SL7	21
1	Queijo de ovelha curado	25/10/2011	<i>Ascl</i> 003/ <i>Apal</i> 004	CC7	Ila	ST7	II	CT2917	SL7	7
18	Queijo de ovelha curado	08/05/2014	<i>Ascl</i> 003/ <i>Apal</i> 004	CC7	Ila	ST7	II	CT2918	SL7	9

Atendendo à Tabela 20, verifica-se que as oito estirpes de *L. monocytogenes* sequenciadas apresentam o mesmo PCR serogrupo Ila, o mesmo complexo clonal CC7 (cgMLST) e a mesma linhagem II. No entanto, verifica-se também que as estirpes com referência 1 e 18 apresentam o mesmo pulsotipo *Ascl* 003/*Apal* 004 mas diferente tipo cgMLST (CT2917 para a estirpe com a referência 1 e CT2918 para a estirpe com a referência 18). Estas duas referências correspondem respetivamente a dois isolados de queijo com origem em 2011 e 2014, verificando-se que, apesar da grande similaridade genética entre eles, não podemos considerar tratar-se de um caso de persistência.

Considerando as restantes estirpes sequenciadas, relativas aos anos 2015 e 2016, e com as referências 25, 28, 44, 51, 71, 76, verificamos que todas apresentavam um perfil PFGE do tipo *AscI* 007/*Apal* 002. Neste caso, a genotipagem diferenciou a estirpe de *L. monocytogenes* com a referência 51 (proveniente de leite cru de ovelha obtido em 2015) das restantes estirpes de 2015 e 2016. A estirpe 51 apresentou o tipo cgMLST CT2916 e as estirpes 25, 28, 44, 71 e 76 apresentaram o tipo cgMLST CT2915.

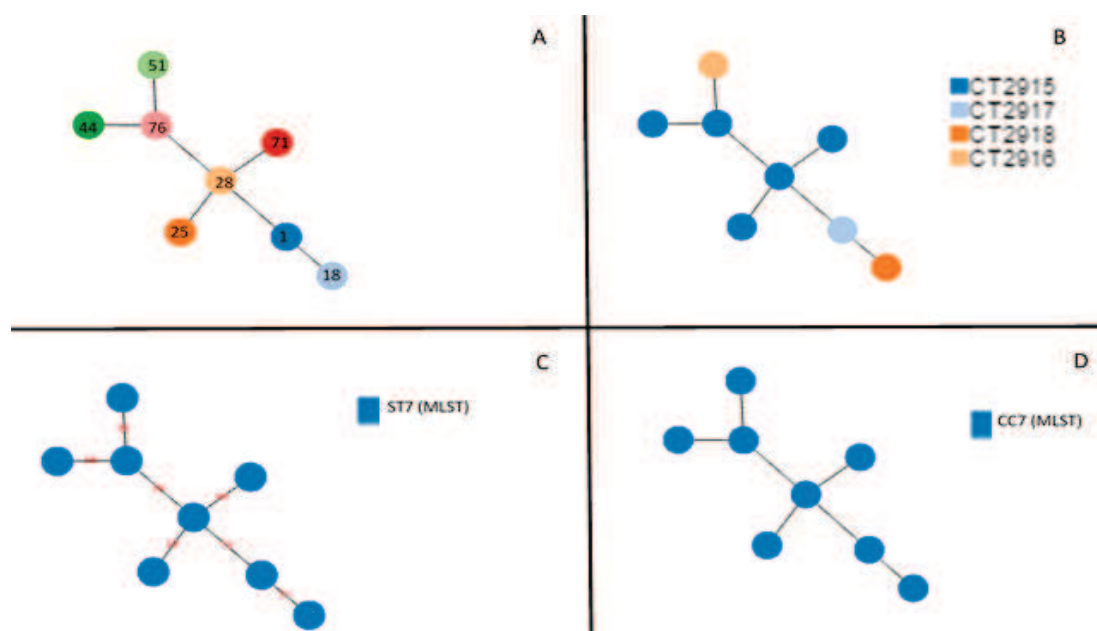
O facto de as estirpes de *L. monocytogenes* com as referências 25 (esfregaço de parede da câmara 4, 2016), 28 (esfregaço lava-mãos, 2016), 44 (mãos de manipulador da queijaria, 2015), 71 (queijo, 2015) e 76 (queijo, 2016) apresentarem o mesmo tipo cgMLST CT2915 leva-nos a concluir que esta é uma estirpe persistente no ambiente da queijaria e que está na origem da contaminação dos queijos produzidos pela queijaria durante os anos 2015 e 2016. Conclui-se também, como já era de esperar, que o método de tipagem por cgMLST tem um maior poder discriminatório do que o PFGE (Moura *et al.*, 2016).

Para avaliar as relações genéticas entre os oito isolados de *L. monocytogenes* comparou-se os perfis alélicos que compõem a sequência cgMLST (Figuras 13 e 14).



**Figura 13:** Análise baseada em cgMLST dos oito isolados de *Listeria monocytogenes*. Árvores de abrangência mínima completa - GoeBURST (realizadas com PHYLOViZ) exibindo as relações genéticas dos 8 isolados de *Listeria monocytogenes*. As árvores são codificadas por cores de acordo com nomes de isolados (A), a linhagem filogenética (B), o PCR serogrupo (C) e a linhagem (D). Cada círculo representa um clone (nomes de isolados mostrados no painel A) com um perfil cgMLST exclusivo.

Na Figura 13 estão representadas as relações genéticas entre as oito estirpes de *L. monocytogenes* (Figura 13-A), na qual é possível verificar que as estirpes apresentam a mesma linhagem filogenética (Figura 13-B), o mesmo PCR serogrupo: Ila (Figura 13-C) e a mesma linhagem: II (Figura 13-D).



**Figura 14:** Análise baseada em cgMLST dos oito isolados de *Listeria monocytogenes*. Árvores de abrangência mínima completa - GoeBURST (realizadas com PHYLOViZ) exibindo as relações genéticas dos 8 isolados de *Listeria monocytogenes*. As árvores são codificadas por cores de acordo com nomes de isolados (A), tipo cgMLST (B), ST's (MLST)(C) e complexo clonal (MLST) (D). Cada círculo representa um clone (nomes de isolados mostrados no painel A) com um perfil cgMLST exclusivo. Os números nas linhas de conexão no painel C representam distâncias alélicas entre clones.

Na Figura 14 estão representadas as relações genéticas entre os oito isolados de *L. monocytogenes* tendo em conta o tipo cgMLST (Figura 14-B), evidenciando a existência de quatro tipos de cgMLST, a designação ST (Figura 14-C), mostrando que os isolados apresentam todos ST7 e o complexo clonal (CC) (Figura 14-D), exibindo o mesmo CC7 para todos os isolados. A Figura 14-C apresenta o valor absoluto das distâncias alélicas entre os isolados.

Chen *et al.* (2016), analisaram por cgMLST isolados de diferentes surtos de listeriose de fonte comum, no qual identificaram isolados de *L. monocytogenes* com perfil CC7/ST7 de três surtos: um surto com meloas em múltiplos estados dos EUA em 2011 (CDC, 2017a), um surto de cabeça de queijo ou cabeça de xara (patê feito com as partes moles da cabeça do porco) em 2010 (CDC, 2017a) e um surto em 2014-2016, na Itália. Apesar dos surtos referidos atrás estarem associados ao complexo clonal CC7, o mesmo identificado nas estirpes estudadas neste trabalho, este complexo clonal não é considerado hipervirulento, o que poderá justificar a inexistência de casos de listeriose em Portugal associados ao consumo destes queijos. Maury *et al.* (2016) concluíram que *L. monocytogenes* apresenta um reduzido número de clones principais e que, destes, os complexos clonais CC1, CC2, CC4 e CC6 são hipervirulentos, representando quase metade das estirpes de origem clínica, enquanto CC9 e CC121 são hipovirulentos e representam mais de 40% das estirpes isoladas de amostras alimentares.

Por outro lado, Kucerova *et al.* (2016) estudaram 100 estirpes associadas a surtos de listeriose nos EUA entre 1983 e 2016 e concluíram que a seguir às estirpes de *L. monocytogenes* da linhagem I (associadas a 65% dos casos de listeriose), as estirpes da linhagem II foram responsáveis por 33% dos casos de listeriose, sendo o ST7/CC7 o perfil mais frequentemente encontrado nas estirpes da linhagem II.

### **10.5. Atividade bactericida dos desinfetantes químicos**

A avaliação da atividade bactericida dos desinfetantes químicos foi realizada segundo o procedimento descrito na Norma EN 1040/2005.

Foi realizada a validação do método para *Listeria monocytogenes* para os quatro detergentes/desinfetantes em estudo.

Assim, os resultados da validação para cada detergente/desinfetante (I, II, III e IV) encontram-se nos Anexos I, II, III e IV, respetivamente.

Após validação do método e escolha do neutralizante, testaram-se 52 das 77 culturas de *L. monocytogenes* estudadas neste trabalho, conforme o critério descrito no ponto 9.6.2. A origem destas 52 culturas, todas provenientes da mesma queijaria, é a seguinte: queijo de ovelha curado (n=27), queijos de ovelha à saída da prensa (n=2), leite cru de ovelha (n=9), esfregaços de mãos (n=3) e esfregaços de superfície (n=11).

Para a avaliação da atividade bactericida, foram testados 3 detergentes/desinfetantes (I, II, III) em 49 isolados e 1 detergente/desinfetante (IV) apenas nas 3 estirpes de *L. monocytogenes* isoladas de esfregaços de mãos, por este ser uma loção para lavagem de mãos com ação desinfetante.

Para obtenção dos resultados foram realizados os cálculos para obtenção do valor da redução logarítmica “R”, conforme indicado na Norma EN 1040/2005.

Assim, todas as concentrações do detergente/desinfetante IV demonstraram atividade bactericida em todos os isolados de *L. monocytogenes* testados (n=3). Atendendo a estes resultados, confirma-se que o detergente/desinfetante IV é eficaz na lavagem e desinfeção das mãos dos operadores da queijaria.

A Tabela 21 apresenta os resultados obtidos após avaliação da actividade bactericida dos detergentes/desinfetantes I, II e III.

**Tabela 21:** Número de isolados de *Listeria monocytogenes* que resistiram à atividade bactericida das concentrações teste dos desinfetantes I, II e III, após o tempo de contacto (5 e 15 minutos).

N=49	Concentração testada	Número (%) de isolados de <i>L. monocytogenes</i> que resistiram	
		5 min	15 min
Desinfetante I	80%	0	0
	5%	2,0% (n=1)	0
	2%	2,0% (n=1)	0
Detergente/Desinfetante II	80%	0	0
	5%	4,1%(n=2)	0
	2%	6,1% (n=3)	6,1% (n=3)
Desinfetante III	80%	0	0
	5%	8,1% ( n=4)	6,1% (n=3)
	2%	10,2% (n=5)	8,1% (n=4)

A Tabela 22 evidencia os isolados de *L. monocytogenes* que apresentaram resistência à acção do desinfetante I, detergente/desinfetante II e desinfetante III, nas concentrações de 5 e 2%, após os tempos de contacto de 5 e 15 minutos relacionando com o serogrupo de cada isolado bacteriano.

**Tabela 22:** Isolados de *Listeria monocytogenes* que apresentaram resistência “X” aos detergentes/desinfetantes testados e respetivo PCR serogrupo “X1”-resistência ao desinfetante I, “X2”-resistência ao detergente/desinfetante II, “X3”-resistência ao desinfetante III.

Refª	Origem	Deter./Desinf.			Concentração		Tempo de contacto	PCR Serogrupo
		I	II	III	5%	2%		
24	Esfregação ao ralo (s. lavagem)			X3	X3	X3	15 min	Ila
25	Esfregação à parede (câmara 4)			X3	X3	x3	15 min	Ila
26	Esfregação ao ralo (câmara 4)	X1	X2		X1	X1, X2	5 min (X1)	Ila
							15 min (X2)	
27	Esfregação à parede (câmara 6)		X2	X3	X2	X2, X3	15 min	Ila
28	Esfregação ao lava mãos (s. expedição)		X2	X3	X2	X2, X3	15 min	Ila

Os resultados evidenciam a resistência de 5 estirpes de *L. monocytogenes* (24, 25, 26, 27 e 28), isoladas de esfregaços de superfície das instalações da queijaria aos desinfetantes I e III e ao detergente/desinfetante II (Tabela 22).

O desinfetante I não apresentou atividade bactericida na estirpe 26, isolada do ralo da câmara 4. Esta estirpe de *L. monocytogenes* foi resistente às concentrações de 2% e 5%, após 5 minutos de contacto. No entanto, o desinfetante I evidenciou atividade bactericida sob a estirpe 26 nas concentrações de 2 e 5% após 15 minutos de contacto.

Segundo as recomendações de utilização (Tabela 12) do desinfetante I, a concentração de utilização é de 2-3% durante 10-30 minutos. Contudo, atendendo aos resultados obtidos, é de realçar que a concentração mínima bactericida (CMB) do desinfetante passou de 2 para 5%, para o tempo de contacto de 15 minutos, o qual pode ser utilizado atendendo ao intervalo de tempos de contacto (10-30 min) recomendado pelo fabricante. O desinfetante I tem como substâncias biocidas o peróxido de hidrogénio e o ácido paracético. Várias hipóteses de mecanismos de resistência ao peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) têm sido estudadas (Boura *et al.*, 2016; Lou e Yousef, 1997; Rea *et al.*, 2004; Rea *et al.*, 2005).

A resistência de *L. monocytogenes* a concentrações mínimas bactericidas de (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pode ser parcialmente explicada pela indução de um fator sigma ( $\sigma^S$ ), que é responsável pelo reconhecimento da RNA polimerase, o que explica a resistência a ambientes adversos (Hengge-Aronis, 1993; Kolter *et al.*, 1993).

Rea e os seus colaboradores (2004), demonstraram o papel de *PerR* no ciclo infeccioso de *L. monocytogenes*. *PerR* é uma proteína metaloreguladora que consiste em dois domínios de ligação a iões metálicos, com o ião zinco tem um papel estrutural e com o ião Fe ou Mn apresenta um papel regulador. *PerR* regula uma série de genes que desempenham um papel crítico na defesa contra o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Gaballa e Helmann, 2002; Herbig e Helmann, 2001). Em 2005, Rea *et al.*, estudaram a sensibilidade de *L. monocytogenes* ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> devido ao papel de *PerR* na defesa contra a ação do peróxido de hidrogénio. Concluíram que a eliminação do gene que codifica para *PerR*, diminui a aptidão da célula, o que resulta numa taxa de crescimento mais lenta e aumento da sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Contudo, impõe uma pressão de selecção na célula, o que resulta numa mutação secundária não identificada, diminuindo a regulação de *PerR* para um nível que restaura a aptidão da célula aumentando a resistência ao peróxido de hidrogénio.

Boura e os seus colaboradores (2016) investigaram o papel do regulador *SigB* na resistência ao peróxido de hidrogénio, por parte de *L. monocytogenes*. *SigB* é o regulador central de genes de stresse em bactérias Gram-positivas, como *L. monocytogenes*. Este regulador desempenha um papel importante na resistência a várias condições de stresse como ácido, calor, sal, ácidos biliares (Sue *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2003), bem como o stresse oxidativo causado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ferreira *et al.*, 2001; Oliver *et al.*, 2010).

Este estudo mostrou que, embora o *SigB* seja importante para a resistência no geral, houve um desvio importante desse padrão que ocorreu quando as estirpes de *L. monocytogenes* estiveram em contacto com o peróxido de hidrogénio em condições aeróbias em fase estacionária. Isto porque o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é um subproduto do crescimento aeróbio, sendo de esperar respostas celulares contra ele (por exemplo, atividade de catalase) em condições aeróbicas (van Schaik *et al.*, 2005).

Em condições anaeróbicas, não se espera que haja formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que pode resultar na ausência de respostas ao peróxido de hidrogénio. A expressão de *SigB* é afetada pela fase de crescimento celular, uma vez que culturas de *L. monocytogenes* cultivadas aerobicamente, na fase semi-exponencial foram altamente sensíveis a baixas concentrações (1%) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superando em sensibilidade as cultivadas anaerobicamente (Boura *et al.*, 2016). Concluí-se, portanto que a expressão do regulador *SigB* depende de vários fatores como a presença/ausência de oxigénio e a fase de crescimento das células de *L. monocytogenes*.

O detergente/desinfetante II não apresentou atividade bactericida sobre as estirpes 26, 27 e 28 (Tabela 25). A estirpe 26, isolada do ralo da câmara 4, resistiu ao detergente/desinfetante II na concentração de 2% após 15 minutos de contacto, mas na concentração de 5%, o detergente/desinfetante II evidenciou atividade bactericida sob a estirpe 26 tanto após 5 como 15 minutos de contacto. As estirpes 27 e 28 de *L. monocytogenes* foram isoladas de esfregaços da parede da câmara 6 e lava mãos da zona de expedição, respetivamente. Ambas apresentaram o mesmo comportamento de resistência ao detergente/desinfetante II. Quando sujeitas à atividade do detergente/desinfetante II, as estirpes 27 e 28 foram resistentes para concentrações de 2 e 5 % após 15 minutos de contacto. Atendendo às regras de utilização do detergente/desinfetante II (concentração de 2%, durante 15-20 minutos) e aos resultados obtidos para as estirpes 26, 27 e 28, é possível observar que a CMB recomendada já não apresenta atividade bactericida após 15 minutos de contacto, para as 3 estirpes. Não se avaliou a atividade bactericida do detergente/desinfetante II a 2% durante 20 minutos de contacto, mas estudou-se a concentração de 5% após 15 minutos de contacto o que evidenciou que as 3 estirpes toleram uma concentração de 5% após 15 minutos de contacto. Conclui-se então que nem a concentração de 2% (CMB), recomendada para o detergente/desinfetante II, nem a 5% conseguem exercer atividade bactericida sobre as estirpes 26, 27 e 28 de *L. monocytogenes* isoladas das instalações da queijaria.

A substância biocida presente no detergente/desinfetante II é hipoclorito de sódio. A sobrevivência de *L. monocytogenes* a soluções salinas é atribuída, principalmente, à acumulação de três solutos compatíveis: glicina betaína, carnitina e prolina (Beumer *et al.*, 1994). A acumulação de glicina betaína e carnitina ocorre através de dois transportadores de betaína glicina codificados pelo gene *betL*, pelo operão *gbu* e um transportador de carnitina codificado pelo operão *opuC*. Tanto o *betL* como o *opuC* têm promotores  $\sigma^B$ - dependentes (Fraser *et al.*, 2000; Sleator *et al.*, 1999).

A ausência de  $\sigma^B$  compromete a capacidade de *L. monocytogenes* de utilizar a glicina betaína ou a carnitina como um soluto compatível (Becker *et al.*, 1998). Gardan *et al.*, (2003) estudaram a capacidade de *L. monocytogenes* para resistir a soluções salinas e alcalinas. Estes investigadores concluíram que em *L. monocytogenes*, a expressão do fator  $\sigma^B$  é fortemente induzida pelo stresse salino e, conseqüentemente, a expressão dos genes sob o controlo deste fator sigma também é induzida pelo stresse alcalino (Gardan *et al.*, 2003).

Foram identificados dois genes, *ClpC* e *ClpP*, codificando uma ATPase de *ClpC* e uma serina protease de *ClpP*, respectivamente, (Gaillot *et al.*, 2000; Rouquette *et al.*, 1998). A transcrição dos genes, *ClpC* e *ClpP*, que codificam uma ATPase de *ClpC* e uma serina protease de *ClpP*, respectivamente, confere resistência às condições ambientais adversas, no geral. Um estudo, identificou o gene *relA*, que codifica a (*p*) *ppGpp* sintetase, como um gene envolvido na osmotolerância por meio de um mecanismo diferente do mecanismo que envolve a acumulação de solutos compatíveis (Okada *et al.*, 2002). Foi também demonstrado que a proteína *Ctc* de *L. monocytogenes* está envolvida na osmotolerância na ausência de quaisquer solutos compatíveis no ambiente (Gaillot *et al.*, 2000; Gardan *et al.*, 2003). Assim, verifica-se que os mecanismos de resistência a soluções como o hipoclorito de sódio são complexos e os estudos efetuados não nos informam de forma clara os mecanismos utilizados por *L. monocytogenes*.

O desinfetante III não evidenciou actividade bactericida nas estirpes 24, 25, 27 e 28. As estirpes 24 e 25 correspondem, respetivamente, a estirpes isoladas de esfregaço ao ralo da sala de lavagem e esfregaço da parede da câmara 4. Ambas apresentaram resistência ao desinfetante III, nas concentrações de 2 e 5%, após o tempo de contacto de 15 minutos. O desinfetante III não apresentou atividade bactericida sobre as estirpes 27 e 28 de *L. monocytogenes*, isoladas de esfregaço às paredes da câmara 6 e lava mãos da sala de expedição, respetivamente, na concentração de 2% após 15 minutos de contacto.

Relacionando as recomendações de utilização do desinfetante III, que indicam uma concentração de 2%, durante 15 minutos, com os resultados obtidos do estudo da atividade bactericida dos mesmos, verifica-se que para as estirpes 24, 25, 27 e 28 de *L. monocytogenes*, a concentração mínima bactericida (CMB) recomendada pelo fornecedor do desinfetante III, não é eficaz. No entanto, este estudo mostra que a concentração 5% deve ser a utilizada na desinfecção das paredes da câmara 6 bem como no lava mãos da sala de expedição, por esta ser considerada a CMB. Contudo, para determinar a CMB a utilizar na desinfecção da sala de lavagens e das paredes da câmara 4, teriam que ser estudadas concentrações acima dos 5%, bem como tempos de contacto acima de 15 minutos.

O desinfetante III, enquadra-se na categoria de compostos de amónia quaternários (QAC's), sendo um tipo de desinfetante muito utilizado nas indústrias alimentares. Na indústria alimentar, *L. monocytogenes* é sujeita a diferentes desinfetantes em concentrações mínimas inibitórias. Contudo, alguns desinfetantes não são totalmente biodegradados, permitindo assim a persistência de *L. monocytogenes* por longos períodos de tempo nas instalações de processamento de alimentos. Por exemplo, a biodegração dos QAC's requer condições aeróbias, o que resulta em flutuações nas concentrações dos desinfetantes (Tezel e Pavlostathis, 2015). Como resultado da frequente exposição a concentrações mínimas inibitórias de QAC's, as estirpes de *L. monocytogenes* vão persistindo e desenvolvendo resistência a estes desinfetantes ao longo do tempo (Ortiz *et al.*, 2016).

O cloreto de benzalcónio (BC) é um tipo de QAC comumente utilizado, o qual contém uma mistura de moléculas com comprimentos de cadeia alquilo de C12-C16. Tem sido demonstrado que *L. monocytogenes* possui pelo menos dois determinantes genéticos que melhoram a sua tolerância aos QAC's, *qacH* (Müller *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2014) e *bcrABC* (Dutta *et al.*, 2013). Recentemente, foi demonstrado que a transposição *Tn6188* é responsável pelo aumento da tolerância aos QAC's através da transcrição de *qacH*, contribuindo para a sobrevivência e persistência de *L. monocytogenes* (Müller *et al.*, 2014), nas instalações da indústria alimentar. O estudo de Møretrø *et al.* (2017), também veio demonstrar que os genes que conduzem ao aumento da tolerância aos QAC's são comumente encontrados em estirpes de *L. monocytogenes* isoladas das instalações da indústria alimentar. Estes genes de efluxo permitem a adaptação e crescimento de *L. monocytogenes* na presença de concentrações residuais de QAC's em nichos onde a bactéria é exposta a concentrações subletais de desinfetantes. O enxaguamento completo após a desinfecção ou a alternância com outro tipo de desinfetante pode evitar a acumulação de isolados de *L. monocytogenes* tolerantes aos compostos de amónia quaternários, na indústria alimentar.

As estirpes resistentes ao desinfetante III, pertencem ao PCR serogrupo IIa (1/2a, 3) e pulsotipo *AscI* 007/*Apa* 002, que é o pulsotipo mais comum nas estirpes de *L. monocytogenes* estudadas. Este pulsotipo também foi isolado de leite cru de ovelha e de queijo de ovelha curado, encontrando-se na queijaria durante 2 anos, 2015-2016.

Assim, este estudo vem relatar mais um caso de persistência de *L. monocytogenes*, numa queijaria, onde a principal entrada da bactéria na queijaria apontada é o leite cru de ovelha, que através de contaminações cruzadas disseminou a bactéria pelas superfícies da queijaria.

## 11. Considerações Finais e Conclusão

Os objetivos do presente trabalho consistiram em realizar a tipagem molecular de 77 estirpes de *Listeria monocytogenes* por PFGE, serotipagem *PCR Multiplex e WGS*, isoladas de diferentes origens tanto alimentares (leite e queijo) como ambientais (esfregações de mãos e superfícies) de uma queijaria no período de 2011 a 2016 como também avaliar a atividade bactericida dos desinfetantes utilizados pela queijaria sobre os pulsotipos de *L. monocytogenes* encontrados, contribuindo para a compreensão da persistência de *L. monocytogenes* na queijaria. Todos os objetivos foram satisfeitos.

As estirpes de *L. monocytogenes* com as referências 25 (esfregação de parede da câmara 4, 2016), 28 (esfregação lava-mãos, 2016), 44 (mãos de manipulador da queijaria, 2015), 71 (queijo, 2015) e 76 (queijo, 2016) apresentaram o mesmo pulsotipo *AscI* 007/*Apal* 002 e o mesmo tipo cgMLST CT2915.

A avaliação da actividade bactericida mostrou que as estirpes 24 (esfregação ralo sala lavagem, 2016), 25 (esfregação parede câmara 4, 2016), 26 (esfregação ralo câmara 4, 2016), 27 (esfregação parede câmara 6, 2016) e 28 (esfregação lava mãos, 2016) apresentaram resistência ao desinfetante III cuja substância biocida são os compostos quaternários de amónia. Tendo em conta que estas cinco estirpes apresentaram o mesmo pulsotipo *AscI* 007/*Apal* 002 e as estirpes com referência 25 e 28 o mesmo tipo cgMLST CT2915.

O presente estudo permitiu concluir que estirpes com CT2915 e pulsotipo *AscI*007/*Apal*002 foram persistentes no ambiente de produção da queijaria, podendo estar na origem da contaminação por *L. monocytogenes* de alguns lotes dos queijos produzidos, analisados no INSA em 2015 e 2016.

## Referências Bibliográficas

**Allerberger, F.; Wagner, M. (2010)** Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(1), 16–23.

**Almeida, G.; Figueiredo, A.; Rola, M.; Barros, R.M.; Gibbs, P.; Hogg, T.; Teixeira, P. (2007)** Microbiological characterization of randomly selected Portuguese raw milk cheeses with reference to food safety. *Journal of Food Protection*, 70(7), 1710–1716.

**Almeida, G.; Magalhães, R.; Carneiro, L.; Santos, I.; Silva, J.; Ferreira, V.; Hogg, T.; Teixeira, P., 2013.** Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. *International Journal of Food Microbiology*, 167(3), 303-9.

**Almeida, G.; Morvan, A.; Magalhães, R.; Santos, I.; Hogg, T.; Leclercq, A.; Teixeira, P. (2010)** Distribution and characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates in Portugal, 1994-2007. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 29(10), 1219–1227.

**Barancelli, G. V.; Silva-Cruz, J. V.; Porto, E.; Oliveira, C. A. F. (2011)** *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. *Archives Italiennes de Biologie*, 78(1), 155-168.

**Becker, L. A.; Cetin, M. S.; Hutkins, R. W.; Benson, A. K. (1998)** Identification of the gene encoding the alternative sigma factor B from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *Journal of Bacteriology*, 180, 4547–4554.

**Bennett, J. E., Dolin, R.; Blaser, M. J. (2014)** Principles and practice of infectious diseases. Mandell G, B. J., Dolin R Editors. 8 ed.

**Bertsch, David; Rau, Jörg; Eugster, Marcel R.; Haug, Martina C.; Lawson, Paul A.; Lacroix, Christophe; Meile, Leo. (2013)** *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 526-532.

**Beumer, R. R.; Te Giffel, M. C.; Cox, L. J.; Rombouts, F. M.; Abee, T. (1994)** Effect of exogenous proline, betaine, and carnitine on growth of *Listeria monocytogenes* in a minimal medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1359– 1363.

**Bille, J.; Blanc, D.S.; Schmid, H.; Boubaker, K.; Baumgartner, A.; Siegrist, H.H.; Tritten, M.L.; Lienhard, R.; Berner, D.; Anderau, R. (2006)** Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland, 2005. *European Surgical Research*, 11(6), 91–93.

**Borucki, M. K.; Call, D. R. (2003)** *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 5537-5540.

**Carle, G. F.; Frank, M.; Olson, M. V. (1986)** Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science*. 232, 65-68.

**Carle, G. F.; Olson, M. V. (1984)** Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 12, 5647-5664.

**Carpentier, B.; Barre, L. (2012)** Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of *Listeria monocytogenes*. [Internet]. Disponível em: <[https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety\\_fh\\_mc\\_guidelines\\_on\\_sampling.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_guidelines_on_sampling.pdf)> Acedido em: 21 abril de 2017.

**Carpentier, B.; Cerf, O. (2011)** Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 1-8.

**CDC.** (2017a) *Listeria* Outbreaks. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/>>. Acedido em: 6 março de 2017.

**CDC.** (2017b) *Listeria* (Listeriosis). Disponível em: <<https://www.cdc.gov/listeria/>>. Acedido em 6 março 2017.

**CDC.** (2017c) Whole Genome Sequencing (WGS). Disponível em: <<https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/wgs/>> Acedido em: 7 março de 2017

**Charlier, C;** Leclercq, A; Cazenave, B; Desplaces, N; Travier, L; Cantinelli, T; Lortholary, O; Goulet, V; Le Monnier, A; Lecuit, M. (2012) *Listeria monocytogenes*-associated joint and bone infections: a study of 43 consecutive cases. *Clinical Infectious Diseases*, 54(2), 240-248.

**Charlier-Woerther, C;** Leclercq, A; Lortholary, O. (2009) Listeriosis, a rare but severe foodborne infection. *La Revue Du Praticien*, 20, 59(7), 905-911.

**Chen, Y.;** Gonzalez-Escalona, N.; Hammack, T. S.; Allard, M. W.; Strain, E. A.; Brown, E. W. (2016) Core genome multilocus sequence typing for identification of globally distributed clonal groups and differentiation of outbreak strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 6258–6272.

**Chu, G.;** Vollrath, D.; Davis, R. W. (1986) Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science*. 234, 1582-1585.

**Codex Standard 283.** (1978) Codex General Standard for cheese.

**Cole, M. B.;** Jones, M. V.; Holyoak, C. (1990) The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(1), 63-72.

**Cone, L. A.;** Leung, M. M.; Byrd, R. G.; Annunziata, G. M.; Lam, R. Y.; Herman, B. K. (2003) Multiple cerebral abscesses because of *Listeria monocytogenes*: three case reports and a literature review of supratentorial listerial brain abscess(es). *Surgical Neurology*, 59(4), 320-328.

**Cossart, P.;** Lebreton, A. (2014) A trip in the “New Microbiology” with the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *FEBS Letters*, 588(15), 2437-2445.

**Crum, N. F.** (2002) Update on *Listeria monocytogenes* infection. *Current Opinions in Gastroenterology*, 4, 287-296.

**de Valk, H.;** Jacquet, C.; Goulet, V.; Vaillant, V.; Perra, A.; Desenclos, J. C. (2003) Feasibility study for a collaborative surveillance of *Listeria* infections in Europe. Report to the European Commission. DG SANCO, Paris.

**Dee, R.;** Lorber, B. (1986) Brain abscess due to *L. monocytogenes*: case report and literature review. *Reviews of Infectious Diseases*, 8(6), 968-77.

**Deisingh, A. K.;** Thompson, M. (2004) Strategies for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 419–429.

**Delhalle, L.;** Ellouze, M.; Yde, M.; Clinquart, A.; Daube, G.; Korsak, N. (2012) Retrospective analysis of a *Listeria monocytogenes* contamination episode in raw milk goat cheese using quantitative microbial risk assessment tools. *Journal of Food Protection*, 75(12), 2122-2135.

**den Bakker, H. C.;** Warchocki, S.; Wright, E. M.; Allred, A. F.; Ahlstrom, C.; Manuel, C. S.; Stasiewicz, M. J.; Burrell, A.; Roof, S. (2014) *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 1882–1889.

**Despacho n.º 15385-A/2016** publicado no *Diário da República*, 2.ª série — N.º 243 — 21 de dezembro de 2016, do Ministério da Saúde/Direção-Geral da Saúde.

**Di Ciccio, P.**; Meloni, D.; Festino, A.R.; Conter, M.; Zanardi, E.; Ghidini, S.; Vergara, A.; Mazzette, R.; Ianieri, A. (2012) Longitudinal study on the sources of *Listeria monocytogenes* contamination in cold-smoked salmon and its processing environment in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 158(1), 79-84.

**Diretiva 96/23/CE** do conselho de 29 de abril de 1996 relativa às medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respetivos produtos e que revoga as Diretivas 85/358/CEE e 86/469/CEE e as Decisões 89/187/CEE e 91/664/CEE.

**Doijad, S.**; Weigel, M.; Barbuddhe, S.; Blom, J.; Goesmann, A.; Hain, T.; Chakraborty, T. (2015) Phylogenomic grouping of *Listeria monocytogenes*. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(9), 637-646.

**Doijad, S.P.**; Barbuddhe, S.B.; Garg, S.; Poharkar, K.V.; Kalorey, D.R.; Kurkure, N.V. 2015. Biofilm-forming abilities of *Listeria monocytogenes* Serotypes Isolated from Different Sources. *PLoS One*, 10(9):e0137046.

**Donlan, R. M.** (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890.

**Doumith, M.**; Buchrieser, C.; Glaser, P.; Jacquet, C.; Martin, P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by Multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 42 (8), 3819-3822.

**EFSA** (European Food Safety Authority); **ECDC** (European Centre for Disease Prevention and Control). (2014) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 2014; 12(2):3547-4312.

**EFSA** (European Food Safety Authority); **ECDC** (European Centre for Disease Prevention and Control). (2016) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal* 2016;14(12):4634-5231.

**EN 1040:2005**. *Chemical disinfectants and antiseptics- Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics – Test method and requirements (phase1)*. Comité Europeu de Normalização. Bruxelas.

**Eyre, D. W.**; Golubchik, T.; Gordon, N. C.; Bowden, R.; Piazza, P.; Batty, E. M.; Ip, C. L.; Wilson, D. J.; Didelot, X.; O'Connor, L.; Lay, R.; Buck, D.; Kearns, A. M.; Shaw, A.; Paul, J.; Wilcox, M. H.; Donnelly, P. J.; Peto, T. E.; Walker, A. S.; Crook, D. W. (2012) A pilot study of rapid benchtop sequencing of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile* for outbreak detection and surveillance. *BMJ Open*, 2: pii\_e001124.

**Farber, J. M.**; Peterkin, P. I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55(3), 476-511.

**Felix, B.**; Dao, T. T.; Lombard, B.; Assere, A.; Brisabois, A.; Roussel, S. (2012) The use of pulsed field gel electrophoresis in *Listeria monocytogenes* sub-typing - harmonization at the European Union level, gel electrophoresis. In: Principles and Basics, Dr. Sameh Magdeldin. InTech.

**Ferreira, A.**, Sue, D.; O'Byrne, C. P.; Boor, K. J. (2003) Role of *Listeria monocytogenes*  $\sigma^B$  in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2692-2698.

**Ferreira, A.**; O'Byrne, C. P.; Boor, K. J. (2001) Role of  $\sigma^B$  in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4454 - 4457.

**Ferreira, E. S. V.** (2010) Implementação da norma ISO 22000:2005 numa Indústria de produção de queijo de Azeitão – DOP. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Alimentar e Qualidade. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa. Portugal.

**Fox, E.;** Hunt, K.; O'Brien, M.; Jordan, K. (2011) *Listeria monocytogenes* in Irish farmhouse cheese processing environments. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 36-45.

**Franco, B. D. G. M.** (2006) Métodos rápidos em microbiologia de alimentos. USP, São Paulo.

**Fraser, K. R.;** Harvie, D.; Coote, P. J.; O'Byrne, C. P. (2000) Identification and characterization of an ATP binding cassette L-carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4696-4704.

**Gaballa, A.;** Helmann, J. D. (2002) A peroxide-induced zinc uptake system plays an important role in protection against oxidative stress in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 45, 997-1005.

**Gaillot, O.;** Pellegrini, E.; Bregenholt, S.; Nair, S.; Berche, P. (2000) The *ClpP* serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 35, 1286-1294.

**Gandhi, M.;** Chikindas, M. L. (2007) *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1), 1-15.

**Gardan, R.;** Cossart, P.; The European *Listeria* Genome Consortium; Labadie, J. (2003) Identification of *Listeria monocytogenes* genes involved in salt and alkaline-pH tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (6), 3137-3143.

**Gardan, R.;** Duché, O.; Leroy-Sétrin, S.; The European *Listeria* Genome Consortium; Labadie, J. (2003) Role of *ctc* from *Listeria monocytogenes* in osmotolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 154-161.

**Gardiner, K.;** Laas, W.; Patterson, D. (1986) Fractionation of large mammalian DNA restriction fragments using vertical pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 12, 185-195.

**Garner, D.;** Kathariou, S.; 2016. Fresh produce-associated listeriosis outbreaks, sources of concern, teachable moments, and insights. *Journal of Food Protection*, 79(2), 337-344.

**Gerba, C. P.** (2015) Quaternary ammonium biocides: efficacy in application. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 464-469.

**Glaser, P.;** Frangeul, L.; Buchrieser, C.; Rusniok, C.; Amend, A.; Baquero, F.; Berche, P.; Bloeker, H.; Brandt, P.; Chakraborty, T.; Charbit, A.; Chetouani, F.; Couvé, E.; de Daruvar, A.; Dehoux, P.; Domann, E.; Domínguez-Bernal, G.; Duchaud, E.; Durant, L.; Dussurget, O.; Entian, K. D.; Fsihi, H.; García-del Portillo, F.; Garrido, P.; Gautier, L.; Goebel, W.; Gómez-López, N.; Hain, T.; Hauf, J.; Jackson, D.; Jones, L. M.; Kaerst, U.; Kreft, J.; Kuhn, M.; Kunst, F.; Kurapkat, G.; Madueno, E.; Maitournam, A.; Vicente, J. M.; Ng, E.; Nedjari, H.; Nordsiek, G.; Novella, S.; de Pablos, B.; Pérez-Díaz, J. C.; Purcell, R.; R Emmel, B.; Rose, M.; Schlueter, T.; Simoes, N.; Tierrez, A.; Vázquez-Boland, J. A.; Voss, H.; Wehland, J.; Cossart, P. (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*, 294(5543), 849-852.

**Goering, R. V.** (2010) Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 866-875.

**Goulet, V.;** King, L. A.; Vaillant, V.; de Valk, H. (2013) What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infectious Diseases*, 13, 11.

**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. (2010) *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 1280-1288.

**Graves, L. M.;** Swaminathan, B. (2001) PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 65 (1-2), 55-62.

- Gray, M. L.; Killinger, A. H. (1966)** *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriological Reviews*, 30(2), 309–382.
- Greig, J. D.; Ravel, A. (2009)** Analysis of foodborne outbreak data reported internationally or source attribution. *International Journal of Food Microbiology*, 130(2), 77–87.
- Guillet, Christelle; Join-Lambert, Olivier; Le Monnier, Alban; Leclercq, Alexandre; Mechaï, Frédéric; Mamzer-Bruneel, Marie-France; Bielecka, Magdalena K.; Scotti, Mariela; Disson, Olivier; Berche, Patrick; Vazquez-Boland, José; Lortholary, Olivier; Lecuit, Marc. (2010)** Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases*, 16 (1), 136–138.
- Guinee, T. P.; Fox, P. F. (2004)** Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3ª Edição. Elsevier Academic Press, 1, 207.
- Haase, J.K.; Didelot, X.; Lecuit, M.; Korkeala, H. (2014)** The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale multilocus sequence typing study. *Environmental Microbiology*, 16(2), 405–416.
- Halter, E. L.; Neuhaus, K.; Scherer, S. (2013)** *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 641–647.
- Hengge-Aronis, R. (1993)** Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell*, 72, 165–168.
- Herbig, A. F.; Helmann, J. D. (2001)** Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* *PerR* peroxide regulon repressor with operator DNA. *Molecular Microbiology*, 41, 849–859.
- Hitchins, A. D.; Jinneman, K.; Chen, Y. (2016)** BAM: Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. *Bacteriological Analytical Manual*. U. S. Food and Drug Administration.
- Ho, A. J.; Lappi, V. R.; Wiedmann, M. (2007)** Longitudinal monitoring of *Listeria monocytogenes* contamination patterns in a farmstead dairy processing facility. *Journal of Dairy Science*, 90 (5), 2517–2524.
- Hof, H. (2001)** *Listeria monocytogenes*: a causative agent of gastroenteritis? *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(6), 369–373.
- Hof, H. (2004)** An update on the medical management of listeriosis. *Journal Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 5(8), 1727–1735.
- Holah, J. T. (1995)** Disinfection of food production areas. *Reveu Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 14(2), 343–363.
- Hunt, Karen; Drummond, Niall; Murphy, Mary; Butler, Francis; Buckley, Jim; Jordan, Kieran. (2013)** A case of bovine raw milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Irish Veterinary Journal*, 65(1), 13.
- Hyden, P.; Pietzka, A.; Lennkh, A.; Murer, A.; Springer, B.; Blaschitz, M.; Sensen, C. W. (2016)** Whole genome sequence-based serogrouping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Journal of Biotechnology*, 235, 181–186.
- Hyden, Patrick; Pietzka, Ariane; Lennkh, Anna; Murer, Andrea; Springer, Burkhard; Blaschitz, Marion; Indra, Alexander; Huhulescu, Steliana; Allerberger, Franz; Ruppitsch, Werner; Sensen, Christoph W. (2016)** Whole genome sequence-based serogrouping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Journal of Biotechnology*. 235, 181–186.
- Iannetti, L.; Acciari, V. A.; Antoci, S. Addante, N.; Bardasi, L.; Bilei, S.; Calistri, P.; Cito, F.; Cogoni, P.; D'Aurelio, R.; Decastelli, L.; Iannetti, S.; Iannitto, G.; Marino, A. M. F.; Muliari, R.; Neri, D.; Perilli, M.; Pomilio, F.; Prencipe, V. A.; Proroga, Y.; Santarelli, G. A.; Sericola, M.; Torresi, M.; Migliorati, G. 2016.**

*Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Italy: Prevalence of contamination at retail and characterisation of strains from meat products and cheese. *Food Control*, 68, 55-61.

**ILSI Research Foundation.** (2005) Achieving continuous improvement in reduction in foodborne listeriosis – a risk based approach. Risk Science Institute. *Journal of Food Protection*, 68(9), 1932–1994.

**INE (Instituto Nacional de Estatística).** (2016) Consumo humano de leite e produtos lácteos per capita (kg/ hab.) por Tipo de leites e produtos lácteos. Anual.

**Iranzo, E. O.; Navarro, R. B.; Gascó, J. J. C.; Cartón, F. L.; Cucart, A. M.** (2015) *Listeria monocytogenes* nas indústrias das carnes. 1ª Edição. Trotta Consulting, S.L. ISBN: 978-84-942180-1-9.

**ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004.** Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method. Geneva: International Organization for Standardization.

**ISO 16140-2:2016.** Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. Geneva: International Organization for Standardization.

**ISO 18593:2004.** Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.

**ISO 11290-2:1998/Amd.1:2004.** Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 2: Enumeration method. Geneva: International Organization for Standardization.

**Jacquet, C.; Gouin, E.; Jeannel, D.; Cossart, P.; Rocourt, J.** (2002) Expression of *ActA*, *Ami*, *InlB*, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 616-22.

**Jadhav, S.; Bhave, M.; Palombo, E. A.** (2012) Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*, 88(3), 327-341.

**Janakiraman, V.** (2008) Listeriosis in pregnancy: diagnosis, treatment, and prevention. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*, 1(4), 179–185.

**Jofré, A.; Martin, B.; Garriga, M.; Hugas, M.; Pla, M.; Rodríguez-Lázaro, D.; Aymerich, T.** (2005) Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. *Food Microbiology*, 22(1), 109-115.

**Junttila, J. R.; Niemala, S. I.; Hirn, J.** (1988) Minimum growth temperature of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *Journal of Applied Bacteriology*, 65(4), 321-7.

**Kabuki, D.Y.; Kuaye, A.Y.; Wiedmann, M.; Boor, K. J.** (2004) Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in Latin-style fresh-cheese processing plants. *Journal of Dairy Science*, 87(9), 2803-2812.

**Kolter, R.; Siegele, D. A.; Tormo, A.** (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annual Review of Microbiology*, 47, 855–874

**Kucerova, Z.; Roache, K.; Stroika, S.; Carleton, H.; Gerner-Smidt, P.; Tarr, C.** (2016) The study of one hundred *Listeria monocytogenes* outbreaks in the United States of America, from 1983-2016 (p.96). Abstract Book of Problems of Listeriosis ISOPOL XIX – June 14-17 2016. Institut Pasteur, Paris, France.

**Kwong, J. C.; Mercouliou, K.; Tomita, T.; Easton, M.; Li, H. Y.; Bulach, D.; Howden, B. P.** (2016) Prospective whole-genome sequencing enhances national surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 54, 333-342.

- Kwong**, J.C.; Mercoulia, K.; Tomita, T.; Easton, M.; Li, H.Y.; Bulach, D.; Stinear, T.P.; Seemann, T.; Howden, B.P. (2016) Prospective whole-genome sequencing enhances national surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 54, 333-342.
- Lachica**, R. V. (1990) Simplified Henry technique for initial recognition of *Listeria* colonies. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(4), 1164-1165.
- Lang Halter**, E.; Neuhaus, K.; Scherer, S. (2013) *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 641-647.
- Larsen**, H. E.; Seeliger, H. P. R. (1966). A mannitol fermenting *Listeria*: *Listeria grayi* sp. n. In *Proceedings of the Third International Symposium on Listeriosis*. Bilthoven.
- Le Monnier**, A.; Leclercq, A. (2009) *Listeria et listériose: des animaux d'élevage à nos assiettes*. *Listeria and listeriosis: From farm to fork*. *Pathologie Biologie*, 57(1), 17-22.
- Leclercq**, A.; Clermont, D.; Bizet, C.; Grimont, P. A. D.; cheMaté, Le Flé; Roche, S. M.; Buchrieser, C.; Cadet-Daniel, V.; Le Monnier, A. (2010) *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 2210-2214.
- Lee**, S. H. I.; Barancelli, G. V.; de Camargo, T. M.; Corassin, C. H.; Rosim, R. E.; da Cruz, A. G.; Cappato, L. P.; de Oliveira, C. A. F. (2017) Biofilm-producing ability of *Listeria monocytogenes* isolates from Brazilian cheese processing plants. *Food Research International*, 91, 88-91.
- Lida**, T.; Kanzaki, M.; Maruyama, T. (1991) Prevalence of *Listeria monocytogenes* in intestinal contents of healthy animals in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 53(5), 873-875.
- Liu**, D. (2006) Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55(6), 645-59.
- Liu**, D. (2008) *Handbook of Listeria monocytogenes*. New York: CRC Press.
- Low**, J. C.; Donachie, W. (1997) A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *The Veterinary Journal*, 153(1), 9-29.
- Ludwig**, W.; Schleifer K.H.; Whitman, W. B. (2009) Family III. *Listeriaceae*. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, 2<sup>a</sup> Edição. 3, 244. Springer, New York.
- Lundén**, J.; Tolvanen, R.; Korkeala, H. (2004) Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *Journal of Dairy Science*, 87, E6-E12.
- Maiden**, M. C.; van Rensburg, M. J.; Bray, J. E.; Earle, S. G.; Ford, S. A.; Jolley, K. A.; McCarthy, N. D. (2013) MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Natural Reviews Microbiology*, 11, 728-736.
- Martin**, P.; Jacquet, C.; Goulet, V.; Vaillant, V.; De Valk, H. (2006) Pulsed-field gel electrophoresis of *Listeria monocytogenes* strains: the PulseNet Europe feasibility study. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3, 303-308.
- Martínez-Suárez**, J. V.; Ortiz, S.; López-Alonso, V. (2016) Potential Impact of the Resistance to Quaternary Ammonium Disinfectants on the Persistence of *Listeria monocytogenes* in Food Processing Environments. *Frontiers in Microbiology*, 7, 638.
- Martins**, A. P. L.; Vasconcelos, M. M. (2003) A qualidade do queijo fabricado com leite cru. Efeito dos principais factores tecnológicos. *Pastagens e Forragens*, 24, 15-33.

**Maury, M. M.; Tsai, Y. H.; Charlier, C.; Touchon, M.; Chenal-Francisque, V.; Leclercq, A.; Criscuolo, A.; Gaultier, C.; Roussel, S.; Brisabois, A.; Disson, O.; Rocha, E.P.; Brisse, S.; Lecuit, M. (2016) Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nature Genetics*, 48, 308–313.**

**McDonnell, G.; Russell, A. D. (1999) Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147–179.**

**McLaughlin, J. (1996.) The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control*, 7(4), 187-193.**

**McLaughlin, J.; Mitchell, R. T.; Smerdon, W. J.; Jewell, K. (2004) *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, 92 (1), 15-33.**

**Mellmann, A.; Harmsen, D.; Cummings, C. A.; Zentz, E. B.; Leopold, S. R.; Rico, A.; Prior, K.; Szczepanowski, R.; Ji, Y.; Zhang, W.; McLaughlin, S. F.; Henkhaus, J. K.; Leopold, B.; Bielaszewska, M.; Prager, R.; Brzoska, P. M.; Moore, R. L.; Guenther, S.; Rothberg, J. M.; Karch, H. (2011) Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One*, 6:e22751.**

**Møretrø, T.; Schirmer, B. C. T.; Heir, E.; Fagerlund, A.; Hjemli, P.; Langsrud, S. (2017) Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 215-224.**

**Møretrø, T.; Schirmer, B. C. T.; Heir, E.; Fagerlund, A.; Hjemli, P.; Langsrud, S. (2017) Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 215–224.**

**Morrison, R. E.; Brown, J.; Goodling, R. S. (1980) Spinal cord abscess caused by *L. monocytogenes*. *Archives of Neurology*, 37(4), 243-244.**

**Mortimore, S.; Wallace, C. (2013) HACCP a practical approach revisited with a view of food safety risk reduction. Springer. New York. Heidelberg Dordrecht London. ISBN: 978-1-4614-5027-6**

**Moura, A.; Criscuolo, A.; Pouseele, H.; Maury, M. M.; Leclercq, A.; Tarr, C.; Björkman, J. T.; Dallman, T.; Reimer, A.; Enouf, V.; Larssonneur, E.; Carleton, H.; Bracq-Dieye, H.; Katz, L. S.; Jones, L.; Touchon, M.; Tourdjman, M.; Walker, M.; Stroika, S.; Cantinelli, T.; Chenal-Francisque, V.; Kucerova, Z.; Rocha, E. P. C.; Nadon, C.; Grant, K.; Nielsen, E. M.; Pot, B.; Gerner-Smidt, P.; Lecuit, M.; Brisse, S. (2016) Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nature Microbiology*, 6, 16185.**

**Müller, A.; Rychli, K.; Muhterem-Uyar, M.; Zaiser, A.; Stessl, B.; Guinane, C. M.; Cotter, P. D.; Wagner, M.; Schmitz-Esser, S. (2013) Tn6188 - a novel transposon in *Listeria monocytogenes* responsible for tolerance to benzalkonium chloride. *PLoS One*, 8(10):e76835.**

**Müller, A.; Rychli, K.; Zaiser, A.; Wieser, C.; Wagner, M.; Schmitz-Esser, S. (2014) The *Listeria monocytogenes* transposon *Tn6188* provides increased tolerance to various quaternary ammonium compounds and ethidium bromide. *FEMS Microbiology Letters*, 361, 166–173.**

**Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology*, 263-273.**

**Murray, E.G.D.; Webb, R. A.; Swann, M. B. R. (1926) A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus, *Bacterium monocytogenes*. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 29(4), 407–439.**

**Mylonakis, E.; Paliou, M.; Hohmann, E. L. (2002) Listeriosis during pregnancy: a case series and review of 222 cases. *Medicine (Baltimore)*. 81(4), 260-9.**

**Noordhout**, C. M.; Devleeschauwer, B.; Angulo, F. J.; Verbeke, G.; Haagsma, J.; Kirk, M.; Havelaar, A.; Speybroeck, N. (2014) The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(11), 1073-1082.

**Noronha**, J. F.; Santos, C.; Malta, M. C.; Azevedo, H. P.; Henriques, C. S.; Madanelo, J. P.; Cabral, A. C.; Almeida, J. L.; Oliveira, M. J.; Amaral, M. S.; Rodrigues, R. M.; Sampaio, F. F.; Branco, J. F.; Melo, A. A.; Guerra, J. (2005) Boas práticas de fabrico em queijarias tradicionais. Escola Superior Agrária de Coimbra. Coimbra, Portugal,

**Nyfeldt**, A. (1929) Etiologie de la mononucleose infecteuse. *Comptes rendus Biologies*, 101, 590.

**Okada**, Y.; Makino, S.; Tobe, T.; Okada, N.; Yamazaki, S. (2002) Cloning of *rel* from *Listeria monocytogenes* as an osmotolerance involvement gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1541-1547.

**Oliver**, H. F.; Orsi, R. H.; Wiedmann, M.; Boor, K. J. (2010) *L. monocytogenes*  $\sigma^B$  has a small core regulon and a conserved role in virulence but makes differential contributions to stress tolerance across a diverse collection of strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 4216 - 4232.

**Ooi**, S.T.; Lorber, B. (2005) Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clinical Infectious Diseases*, 40(9), 1327-1332.

**Ortiz**, S.; López-Alonso, V.; Rodríguez, P.; Martínez-Suárez, J. V. (2016) The connection between persistent, disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two geographically separate Iberian pork processing plants: evidence from comparative genome analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 82 (1), 308-317.

**Parisi**, A.; Latorre, L.; Fraccalvieri, R.; Miccolupo, A.; Normanno, G.; Caruso, M.; Santagada, G. (2013) Occurrence of *Listeria spp.* in dairy plants in Southern Italy and molecular subtyping of isolates using AFLP. *Food Control*, 29(1), 91-97.

**Phan-Thanh**, L.; Gormon, T. (1997) A chemically defined minimal medium for the optimal culture of *Listeria*. *International Journal of Food Microbiology*, 35(1), 91-95.

**Piercey**, M. J.; Hingston, P. A.; Truelstrup Hansen, L. (2016) Genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation at a simulated food processing plant temperature of 15 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 223, 63-74.

**Pightling**, A. W.; Petronella, N.; Pagotto, F. (2015) The *Listeria monocytogenes* Core-Genome Sequence Typer (LmCGST): a bioinformatic pipeline formolecular characterization with next-generation sequence data. *BMC Microbiology*, 15 (224).

**Pintado**, C. M. B. S.; Ferreira, M. A. A. S.; Grant, K. A.; Halford-Maw, R.; Hampton, M. D.; McLauchlin, J. (2007). Investigation of routes of contamination and persistence of *Listeria monocytogenes* in ewe's-milk cheese processing plants in Portugal. ISOPOL XVI – The 16th International symposium on problems of listeriosis”, Savannah, Georgia, USA, 20-23 March.

**Pintado**, C. M. B. S.; Goulão, M. (2011) Serotipagem de *Listeria monocytogenes* por *PCR Multiplex*. Procedimento de acompanhamento das aulas práticas de Microbiologia Avançada. Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar. Escola Superior Agrária. Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal.

**Pintado**, C. M. B. S.; Grant, K. A.; Halford-Maw, R.; Hampton, M. D.; Ferreira, M. A. S. S.; McLauchlin, J. (2009) Association between a case study of asymptomatic ovine listerial mastitis and the contamination of soft cheese and cheese processing environment with *Listeria monocytogenes* in Portugal. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(5), 569-575.

**Pintado**, C.M.B.S.; Oliveira, A.; Pampulha, M.E.; Ferreira, M.A.S.S. (2005) Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *Food Microbiology*. 22(1), 79-85.

**Pirie, J. H. H.** (1927) A new disease of veld rodents." Tiger River Disease". South African Medical Research Council, 3, 163-186.

**Pirie, J. H. H.** (1940) The genus *Listerella* pirie. Science, 91, 383.

**Pita, Joana Serrano Maia.** (2012) Surto de listeriose entre 2009 e 2011 em Lisboa e Vale do Tejo- Investigação e medidas implementadas pela ASAE. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa. Portugal.

**Premaratne, R. J.; Lin, W. J.; Johnson, E. A.** (1991) Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology, 57(10), 3046–3048.

**PulseNet,** (2013) Standard Operating Procedure for PulseNet of *Listeria monocytogenes*. CDC\_PNL04\_abril2013. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/listeria-pfge-protocol-508c.pdf>> Acedido em: 3 novembro de 2016.

**Rea, R. B.; Gahan, C. G. M.; Hill, C.** (2004) Disruption of putative regulatory loci in *Listeria monocytogenes* demonstrates a significant role for *Fur* and *PerR* in virulence. Infection and Immunity, 72, 717–727.

**Regulamento (CE) N.o 1662/2006** da Comissão, de 6 de Novembro de 2006, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. Jornal Oficial da União Europeia.

**Regulamento (CE) N.o 2073/2005** da Comissão de 15 de Novembro de 2005 relativo aos critérios microbiológicos aplicados aos produtos alimentícios. Diário Oficial da União Europeia.

**Regulamento (UE) N.o 1169/2011** do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de Outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia.

**Regulamento (UE) N.o 852/2004** do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia.

**Rocourt, J.; Cossart, P.** (1997) *Listeria monocytogenes*. In: Beuchat LR, Doyle MP, Montville TJ (Eds.), Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington D.C., 337-352.

**Rocourt, J.; Grimont, P. A. D.** (1983) *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 33(4), 866-869.

**Rocourt, J.; Moy, G.; Vierk, K.; Schulndt, J.** (2003) The present state of foodborne disease in OECD countries. Food Safety Department. WHO, Geneva.

**Rodríguez-Lázaro, D.; Maria Pla, M.; Scortti, M.; Monzó, H. J.; Vázquez-Boland, J. A.** (2005) A Novel Real-Time PCR for *Listeria monocytogenes* That Monitors Analytical Performance via an Internal Amplification Control. Applied and Environmental Microbiology, 71, 9008–9012.

**Romick, T. L.; Fleming, H. P.; McFeeters, R. F.** (1996) Aerobic and anaerobic metabolism of *Listeria monocytogenes* in defined glucose medium. Applied and Environmental Microbiology, 62(1), 304–307.

**Rouquette, C.; de Chastellier, C.; Nair, S.; Berche, P.** (1998) The *ClpC* ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. Molecular Microbiology, 27, 1235–1245.

**Ruppitsch, W.; Pietzka, A.; Prior, K.; Bletz, S.; Fernandez, H. L.; Allerberger, F.; Harmsen, D.; Mellmann, A.** (2015a) Defining and evaluating a core genome multilocus sequence typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Listeria monocytogenes*. Journal of Clinical Microbiology, 53, 2869–2876.

**Ruppitsch**, W.; Prager, R.; Halbedel, S.; Hyden, P.; Pietzka, A.; Huhulescu, S.; Lohr, D.; Schönberger, K.; Aichinger, E.; Hauri, A.; Stark, K.; Vygen, S.; Tietze, E.; Allerberger, F.; Wilking, H. (2015b) Ongoing outbreak of invasive listeriosis Germany, 2012 to 2015. *Eurosurveillance*, 20.

**Ryser**, Elliot T.; Marth, Elmer H. (2007) *Listeria, listeriosis, and food safety, third edition*. CRC Press. ISBN: 9781420015188

**Sallen**, B.; Rajoharison, A.; Desvarenne, S.; Quinn, F.; Mabilat, C. (1996) Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 669-674.

**Schlech**, W. F. (2000) Foodborne Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases*, 331(3), 770-775

**Schmid**, D.; Allerberger, F.; Huhulescu, S.; Pietzka, A.; Amar, C.; Kleta, S.; Prager, R.; Preußel, K.; Aichinger, E.; Mellmann, A. (2014) Whole genome sequencing as a tool to investigate a cluster of seven cases of listeriosis in Austria and Germany, 2011-2013. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 431-436.

**Schmid**, D.; Allerberger, F.; Huhulescu, S.; Pietzka, A.; Amar, C.; Kleta, S.; Prager, R.; Preusel, K.; Aichinger, E.; Mellmann, A. (2014) Whole genome sequencing as a tool to investigate a cluster of seven cases of listeriosis in Austria and Germany, 2011 – 2013. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(5), 431-436.

**Schoder**, D.; Melzner, D.; Schmalwieser, A.; Zangana, A.; Winter, P.; Wagner, M. (2011) Important vectors for *Listeria monocytogenes* transmission at farm dairies manufacturing fresh sheep and goat cheese from raw milk. *Journal of Food Protection*. 74(6), 919-924.

**Schoder**, D.; Zangana, A.; Paulsen, P.; Winter, P.; Baumgartner, W.; Wagner, M. (2008) Ovine *Listeria monocytogenes* mastitis and human exposure via fresh cheese from raw milk - The impact of farm management, milking and cheese manufacturing practices. *Milchwissenschaft*, 63(3), 258-262.

**Schönberg**, A.; Bannerman, E.; Courtieu, A.L.; Kiss, R.; McLauchlin, J.; Shah, S.; Wilhelms, D. (1996) Serotyping of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 32,279-287.

**Schuchat**, A.; Swaminathan; B.; Broome, C. V. (1991) Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(2), 169-183.

**Schwartz**, D. C.; Cantor, C. R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37(1), 67-75.

**Seeliger** H. P. R. (1961) *Listeriosis*. English edition foreword by K. F. Meyer (San Francisco) with an introduction to the 2nd german edition by H. Eyer (München). Basel, Karger.

**Seeliger**, H. P. R. (1981) Apathogene listerien: *Listeria innocua* sp. n. (*Seeliger et Schoofs, 1977*). *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*. 1. Abt., Originale, 249, 487-493.

**Seeliger**, H. P. R.; Jones. D. (1986) Genus *Listeria* Pirie 1940. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 2, 1235-1245.

**Seeliger**, H. P. R.; Rocourt, J.; Schrettenbrunner, A.; Grimont, P. A. D.; Jones, D. (1984) *Listeria ivanovii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34 (3), 336-337.

**Senczek**, D.; Stephan, R.; Untermann, F. (2000) Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period. *International Journal of Food Microbiology*, 62 (1-2), 155-159.

**Shahamat**, M.; Seaman, A.; Woodbine. M. (1980) Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentrations. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 246(4), 506-511.

**Silveira, L.**; Pista, Â.; Maia, C.; Barreira, M. J.; Rodrigues, J.; Reis, L.; Machado, J. (2016) Caracterização molecular e suscetibilidade aos antimicrobianos de isolados clínicos de *Listeria monocytogenes* na região de Lisboa e Vale do Tejo em 2015. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. In: Boletim Epidemiológico- Observações. Artigos breves, nº5. 19-22.

**Sjöman, M.** (2010) The use of serotyping and PFGE-Typing of *Listeria monocytogenes* in food processing contamination studies and human foodborne infections. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland.

**Sleator, R. D.**; Gahan, C. G.; Abee, T.; Hill, C. (1999) Identification and disruption of BetL, a secondary glycine betaine transport system linked to the salt tolerance of *Listeria monocytogenes* LO28. Applied and Environmental Microbiology, 65:2078–2083.

**Sohier, R.**; Benazet, F.; Piechaud, M. (1948) Sur un germe du gene *Listeria* apparemment non pathogene. Annales de l'Institut Pasteur/Actualités, 74, 54-57.

**Spanu, C.**; Scarano, C.; Ibba, M.; Spanu, V.; De Santis, E. P. L. (2015) Occurrence and traceability of *Listeria monocytogenes* strains isolated from sheep's milk cheese-making plants environment. Food Control, 47, 318-325.

**Spanu, C.**; Scarano, C.; Ibba, M.; Spanu, V.; De Santis, E. P. L. (2015) Occurrence and traceability of *Listeria monocytogenes* strains isolated from sheep's milk cheese-making plants environment. Food control, 47, 318-325.

**Steenkamp, J. E. M.**; Van Trijp, H. C. M. (1996) Quality guidance: a consumer-based approach to food quality improvement using partial least squares. European Review of Agricultural Economics, 23(2), 195-215.

**Sue, D.**; Fink, D.; Wiedmann, M.; Boor, K. J. (2004)  $\sigma^B$ -dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. Microbiology, 150, 3843–3855.

**Swaminathan, Bala**; Gerner-Smidt, Peter. (2007) The epidemiology of human listeriosis. Microbes and Infection, 9(10), 1236-1243.

**Tezel, U.**; Pavlostathis, S. G. (2015) Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. Current Opinion in Biotechnology, 33, 296–304.

**Tezel, U.**; Pavlostathis, S. G. (2015) Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. Current Opinion in Biotechnology, 33, 296-304.

**Tompkin, R. B.** (2002) Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. Journal of Food Protection, 65(4), 709-725.

**Tourdjman, M.**; Laurent, É.; Leclercq, A. (2014) Zoonoses: Listériose humaine: Une zoonose d'origine alimentaire. Revue Francophone des Laboratoires, 464, 37-44.

**Turabelidze, G.**; Lawrence, S. J.; Gao, H.; Sodergren, E.; Weinstock, G. M.; Abubucker, S.; Wylie, T.; Mitreva, M.; Shaikh, N.; Gautom, R.; Tarr, P. I. (2013) Precise dissection of an *Escherichia coli* O157:H7 outbreak by single nucleotide polymorphism analysis. Journal of Clinical Microbiology, 51, 3950–3954.

**USDA** (United States Department of Agriculture); **FSIS** (Food Safety and Inspection Service). (2017) Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, ready-to-eat siluriformes (fish) and egg products, and environmental samples. Revision 0.10, February 01. In: Laboratory QA Staff.

**van Schaik, W.**; Zwietering, M. H.; de Vos, W. M.; Abee, T. (2005) Deletion of the *sigB* gene in *Bacillus cereus* ATCC 14579 leads to hydrogen peroxide hyperresistance. Applied and Environmental Microbiology, 71, 6427– 6430.

- Vázquez-Boland, J. A.;** Kuhn, M.; Berche, P.; Chakraborty, T.; Domínguez-Bernal, G.; Goebel, W.; Kreft, J. (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 584–640.
- Waak, E.;** Tham, W.; Danielsson-Tham, M.-L. (2002) Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3366–3370.
- Walker J. K.;** Morgan J. H. (1993) Ovine ophthalmitis associated with *Listeria monocytogenes*. *Veterinary Record*, 132, 636.
- Warriner, K.;** Namvar, A. (2009) What is the hysteria with *Listeria*? *Trends in Food Science & Technology*, 20(6), 245-254.
- Weller, D.;** Andrus, A.; Wiedmann, M.; den Bakker, H. C. (2015) *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 65(1), 286–292.
- Welshimer, H. J.;** Meredith, A. L. (1971) *Listeria murrayi* sp. nov.: a nitrate reducing mannitol fermenting *Listeria*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 21, 3-7.
- Wiedmann, M.** (2002) Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. *Journal AOAC*, 85, 524-531.
- Wu, S.;** Wu, Q.; Zhang, J.; Chen, M.; Guo, W. (2016) Analysis of multilocus sequence typing and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from chinese retail ready-to-eat food. *Frontiers in Microbiology*, 7,168.
- Yilmaz, T.;** Moyer, B.; MacDonell, R. E.; Cordero-Coma, M.; Gallagher, M. J. (2009) Outbreaks associated with unpasteurized milk and soft cheese: an overview of consumer safety. *Food Protection Trends*, 29(4), 211-222.
- Yoon, Y.;** Lee, S.; Choi, K. (2016) Review: Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control*, 63, 201–215.

## Anexos

## Anexo I: Resultados da validação do Desinfetante I

Estirpe: *Listeria monocytogenes* ATCC 13932

### Validação e controlos

Suspensão de validação ( $N_{V0}$ )			Controlo das cond. experimentais (A)			Controlo do neutralizante (B)		
$V_{C1}$	83	$\bar{x}=71$	$V_{C1}$	177	$\bar{x}=187,5$	$V_C$ Neut. A	>330	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5$ x $\bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim
$V_{C2}$	59		$V_{C2}$	198		$V_C$ Neut. B	>330	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5$ x $\bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim
$30 \leq \bar{x}$ de $N_{V0} \leq 160$ ? Sim			$\bar{x}$ de A é $\geq 0,5$ x $\bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim			$V_C$ Neut. C	>330	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5$ x $\bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim

Validação do método (C)				
Neut. A	$V_{C1}$	0	$\bar{x}=0$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5$ x $\bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Não
	$V_{C2}$	0		
Neut. B	$V_{C1}$	41	$\bar{x}=40$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5$ x $\bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim
	$V_{C2}$	39		
Neut. C	$V_{C1}$	0	$\bar{x}=0$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5$ x $\bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Não
	$V_{C2}$	0		

### Suspensão

Suspensão-teste (N e $N_0$ )	N	Vc1	Vc2	$\bar{x} \text{ wm} = 2,40 \times 10^8, \lg N = 8,38$ $N_0 = N/10; \lg N_0 = 7,38$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$ ? Sim
	$10^6$	254	232	
	$10^7$	21	22	

### Teste da atividade bactericida do produto

Concentração do produto (%)	$V_{C1}$	$V_{C2}$	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$LgR$ ( $\lg N_0 = 7,38$ )	Tempo de contacto (min)
80	0	0	<140	<2,15	>5,23	5
5	0	0	<140	<2,15	>5,23	5
2	0	0	<140	<2,15	>5,23	5

## Anexo II: Resultados da validação do Detergente/Desinfetante II

Estirpe: *Listeria monocytogenes* ATCC 13932

### Validação e controlos

Suspensão de validação ( $N_{V0}$ )			Controlo das cond. experimentais (A)			Controlo do neutralizante (B)		
$V_{C1}$	83	$\bar{x}=71$	$V_{C1}$	177	$\bar{x}=187,5$	$V_C$ Neut. A	>330	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim
$V_{C2}$	59		$V_{C2}$	198		$V_C$ Neut. B	>330	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim
$31 \leq \bar{x}$ de $N_{V0} \leq 160$ ? Sim			$\bar{x}$ de A é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim			$V_C$ Neut. C	>330	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim

Validação do método (C)				
Neut. A	$V_{C1}$		$\bar{x}=0$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Não
	$V_{C2}$			
Neut. B	$V_{C1}$	75	$\bar{x}=72$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim
	$V_{C2}$	69		
Neut. C	$V_{C1}$	0	$\bar{x}=0$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Não
	$V_{C2}$	0		

### Suspensão

Suspensão-teste ( $N$ e $N_0$ )	$N$	$V_{C1}$	$V_{C2}$	$\bar{x} \text{ wm} = 2,40 \times 10^8, \lg N = 8,38$ $N_0 = N/10; \lg N_0 = 7,38$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$ ? Sim
	$10^6$	254	232	
	$10^7$	21	22	

### Teste da atividade bactericida do produto

Concentração do produto (%)	$V_{C1}$	$V_{C2}$	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$LgR$ ( $\lg N_0 = 7,38$ )	Tempo de contacto (min)
80	0	0	<140	<2,15	>5,23	5
5	2	0	1	0	7,38	5
2	113	102	107,5	2,03	5,35	5

## Anexo III: Resultados da validação do Desinfetante III

Estirpe: *Listeria monocytogenes* ATCC 13932

### Validação e controlos

Suspensão de validação ( $N_{V0}$ )			Controlo das cond. experimentais (A)			Controlo do neutralizante (B)		
$V_{C1}$	83	$\bar{x}=71$	$V_{C1}$	177	$\bar{x}=187,5$	$V_C$ Neut. A	>330	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim
$V_{C2}$	59		$V_{C2}$	198		$V_C$ Neut. B	>330	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim
$32 \leq \bar{x}$ de $N_{V0} \leq 160$ ? Sim			$\bar{x}$ de A é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim			$V_C$ Neut. C	>330	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim

Validação do método (C)				
Neut. A	$V_{C1}$	41	$\bar{x}=42$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim
	$V_{C2}$	43		
Neut. B	$V_{C1}$	0	$\bar{x}=0$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Não
	$V_{C2}$	0		
Neut. C	$V_{C1}$	0	$\bar{x}=0$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Não
	$V_{C2}$	0		

### Suspensão

Suspensão-teste ( $N$ e $N_0$ )	$N$	$V_{C1}$	$V_{C2}$	$\bar{x} \text{ wm} = 2,40 \times 10^8, \lg N = 8,38$ $N_0 = N/10; \lg N_0 = 7,38$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$ ? Sim
	$10^6$	254	232	
	$10^7$	21	22	

### Teste da atividade bactericida do produto

Concentração do produto (%)	$V_{C1}$	$V_{C2}$	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$LgR$ ( $\lg N_0 = 7,38$ )	Tempo de contacto (min)
80	0	0	<140	<2,15	>5,23	5
5	>330	>330	>6600	>3,81	<3,57	5
2	>330	>330	>6600	>3,81	<3,57	5

## Anexo IV: Resultados da validação do Detergente/Desinfetante IV

Estirpe: *Listeria monocytogenes* ATCC 13932

### Validação e controlos

Suspensão de validação ( $N_{V0}$ )			Controlo das cond. experimentais (A)			Controlo do neutralizante (B)		
$V_{C1}$	83	$\bar{x}=71$	$V_{C1}$	177	$\bar{x}=187,5$	$V_C$ Neut. A	>330	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim
$V_{C2}$	59		$V_{C2}$	198		$V_C$ Neut. B	>330	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim
$33 \leq \bar{x}$ de $N_{V0} \leq 160$ ? Sim			$\bar{x}$ de A é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim			$V_C$ Neut. C	>330	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim

Validação do método (C)				
Neut. A	$V_{C1}$	0	$\bar{x}=0$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Não
	$V_{C2}$	0		
Neut. B	$V_{C1}$	50	$\bar{x}=53$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Sim
	$V_{C2}$	56		
Neut. C	$V_{C1}$	0	$\bar{x}=0$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de $N_{V0}$ ? Não
	$V_{C2}$	0		

### Suspensão

Suspensão-teste ( $N$ e $N_0$ )	$N$	$V_{C1}$	$V_{C2}$	$\bar{x} \text{ wm} = 2,40 \times 10^8, \lg N = 8,38$ $N_0 = N/10; \lg N_0 = 7,38$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$ ? Sim
	$10^6$	254	232	
	$10^7$	21	22	

### Teste da atividade bactericida do produto

Concentração do produto (%)	$V_{C1}$	$V_{C2}$	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$LgR$ ( $\lg N_0 = 7,38$ )	Tempo de contacto (min)
100	0	0	<140	<2,15	>5,23	5
80	0	0	<140	<2,15	>5,23	5
70	0	0	<140	<2,15	>5,23	5