



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE PCR E  
NESTED PCR PARA DETECÇÃO DE *LISTERIA*  
*MONOCYTOGENES* EM QUEIJOS MINAS FRESCAL**

**STEFANIA MARCIA DE OLIVEIRA SOUZA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF**

**FEVEREIRO DE 2011**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE PCR E NESTED PCR PARA  
DETECÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM QUEIJOS MINAS FRESCAL**

**ALUNA: STEFANIA MARCIA DE OLIVEIRA SOUZA**

**ORIENTADORA: MÁRCIA DE AGUIAR FERREIRA**

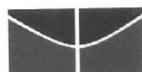
**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EM SAÚDE ANIMAL**

**PUBLICAÇÃO: 038/2011**

**BRASÍLIA/DF**

**FEVEREIRO DE 2011**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE PCR E NESTED PCR PARA  
DETECÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM QUEIJO MINAS  
FRESVAL.

Stefania Marcia de Oliveira Souza

Dissertação de Mestrado submetida ao programa de  
pós – graduação em Saúde Animal, como parte dos  
requisitos necessários para aquisição do grau de  
Mestre em Saúde Animal.

APROVADA POR:

MARCIA DE AGUIAR FERREIRA, Prof.<sup>a</sup> Doutora (UNIVERSIDADE DE  
BRASÍLIA - UnB) (orientador)

LUIS AUGUSTO NERO, Prof. Doutor (UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
VIÇOSA - UFV) (examinador externo)

MARILEUZA D. CHIARELLO, Prof.<sup>a</sup> Doutora, (UNIVERSIDADE CATÓLICA  
DE BRASÍLIA) (examinador externo)

BRASÍLIA/DF 25 DE FEVEREIRO DE 2011.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SOUZA, S.M.O. **Padronização protocolo de PCR e Nested PCR para detecção de *Listeria monocytogenes* em queijos minas frescal**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília, 2011, P.84, Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte dessa dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

SOUZA, Stefania Marcia de Oliveira

**Padronização protocolo de PCR e Nested PCR para detecção de *Listeria monocytogenes* em queijos minas frescal.**

Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2011. 84p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2011.

1. Queijo. 2. Microbiológico. 3. PCR. 4. Nested - PCR.

CDD ou CDU  
Agis / FAO

## DEDICATÓRIA

"Tenha em mente que tudo que você aprende na escola é trabalho de muitas gerações. Receba essa herança, honre-a, acrescente a ela e, um dia, fielmente, deposite-a nas mãos de seus filhos"

Albert Einstein

**Dedico a todos que, de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho e, principalmente, à minha família por me permitir vencer mais esta etapa profissional.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todas as conquistas e por iluminar meu caminho.

À minha mãe, Gloria Maria, pela força, por acreditar e apoiar todas as minhas decisões.

Ao meu querido e saudoso pai, que nos deixou tão precocemente, mas que está presente em minha vida todos os dias e que sem ele nada disto ocorreria.

Ao meu filho, Johnnathan Luiz, por me fazer seguir sempre em frente, e querer mais e melhor.

Aos meus irmãos Roger, Marcel e Fernanda pela força, companheirismo e incentivo.

Às minhas amigas Daniene e Leiry por toda a ajuda e momentos de descontração.

À minha querida Prof. Dra. Márcia de Aguiar Ferreira pela orientação, apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Luis Augusto Nero pela atenção e conhecimento transmitido.

A Prof. Dra. Marileuza D. Chiarello pelo aceite do convite de participação em minha banca.

Aos colegas Isabela (ISA) e Mococa, do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da UFV-MG, pelo apoio fundamental na realização dessa pesquisa.

Às colegas do LAMAL/FAV, Patrícia Helena, Nara, Pamela, Ana Claudia e Milena, pela ajuda durante a execução do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Veterinária/FAV Rafael Magnum, Vinicius e Hudson, pelo companheirismo e pelas conversas nos intervalos.

A todos os professores que, de alguma maneira, contribuíram para realização deste trabalho.

Obrigada !!

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo II

Tabela 1. Frequências dos resultados positivos obtidos na detecção de <i>L. monocytogenes</i> em massas de queijos tipo minas frescal, contaminadas artificialmente por meio de metodologia ISO 11290 e técnicas moleculares de PCR convencional e Nested PCR.....	63
--	----

### Anexos

Tabela 1. Resultados das análises realizadas em massas de queijos minas frescal nos diversos volumes e tratamentos através de metodologia ISO, PCR convencional e PCR Nested.....	82
---	----

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

Figura 1. Mecanismo de invasão de *Listeria monocytogenes*.....22

Figura 2. Protocolo para análise convencional ISO.....26

### Capítulo II

Figura 1. PCR convencional realizado no Dia 0.....65

Figura 2. PCR Convencional realizado no Dia 5.....65

Figura 3. Nested PCR realizado no Dia 0.....66

Figura 4. Nested PCR realizado no Dia 5 .....66

Figura 5. Nested PCR realizado no Dia 10.....67

### Anexos

Figura 1. Esquema gráfico de metodologias e tratamentos realizados .....83

## LISTA DE QUADROS

### Capítulo I

Quadro 1. Características bioquímicas de <i>Listeria</i> spp.....	20
Quadro 2. Surtos e casos, suspeitos e comprovados de listeriose alimentar.....	31
Quadro 3.Ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i> isolada de queijos em diversos países.....	34

## SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT .....	xii
Capítulo I.....	13
1. Introdução .....	13
2. Justificativa .....	16
3. Objetivos .....	17
3.1. Objetivo geral .....	17
3.2. Objetivos específicos .....	17
4. Revisão de literatura .....	18
4.1. Histórico .....	18
4.2. Características fisiológicas.....	18
4.3. Características Bioquímicas.....	19
4.4. Fatores de virulência e patogenia .....	20
4.5. Listeriose em humanos.....	23
4.6. Listeriose em animais .....	23
4.7. Formas de transmissão .....	24
4.8. Diagnóstico, tratamento e profilaxia .....	25
4.8.1. Análises em alimentos .....	25
4.8.2. Análises clínicas e tratamento .....	26
4.8.3. Medidas Profiláticas.....	27
4.9. Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> em alimentos e listeriose .....	28
5. Controle e segurança alimentar .....	35
6. Situação atual .....	36
7. Utilização de técnicas moleculares .....	37
8. Conclusão.....	39
9. Referências bibliográficas .....	40
Capítulo II.....	56
Padronização de um protocolo de PCR e Nested PCR para a detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> em queijos minas frescal.....	56
1. Introdução .....	56
2. Materiais e métodos .....	58

2.1. Cepa de <i>L. monocytogenes</i> e preparo de inóculos.....	58
2.2. Produção de queijo Minas frescal e contaminação artificial .....	59
2.3. Análises microbiológicas .....	60
2.3.1. Coleta de amostras.....	60
2.3.2. Detecção convencional de <i>L. monocytogenes</i> .....	60
2.3.3. Detecção molecular de <i>L. monocytogenes</i> : PCR e Nested PCR.....	60
3. Resultados.....	63
4. Discussão .....	67
5. Conclusão.....	74
6. Referencia Bibliográficas.....	74
Capítulo III.....	80
1. Considerações Finais .....	80
ANEXOS .....	82

## RESUMO

SOUZA, Stefania Marcia de Oliveira. Universidade de Brasília, fevereiro, 2011. Padronização de um protocolo de PCR e Nested PCR para detecção de *Listeria monocytogenes* em queijos minas frescal.

O queijo tipo Minas frescal é um produto fresco caracterizado por possuir alto grau de umidade tornando-o extremamente suscetível à contaminação por diversos microrganismos, inclusive *Listeria monocytogenes* e diversos surtos já foram associados ao consumo de queijos frescos em todo o mundo. Neste trabalho, foi realizado um diagnóstico para detecção de *L. monocytogenes* utilizando três metodologias diferenciadas: ISO 11290, PCR convencional e Nested PCR, em massa de queijo tipo Minas frescal, artificialmente contaminada em tratamentos diferenciados. As amostras da massa do queijo foram analisadas em três momentos diferenciados: no dia da fabricação (Dia 0), cinco dias após a fabricação (Dia 5) e dez dias após a fabricação (Dia 10). Para avaliação das técnicas moleculares foram utilizados volumes de 1mL, 5mL e 10 mL a partir das amostras de queijo minas frescal. Os resultados obtidos demonstraram, que a PCR convencional detectou, a presença do patógeno, em no máximo, 33,3% do total das amostras e, apenas quando foram analisadas no dia 0, não ocorrendo detecção nos demais períodos, indicando baixa sensibilidade em relação às outras metodologias e a Nested PCR, apresentou frequência de detecção de 100% quando utilizado o volume de 1mL na realização da técnica nos três períodos analisados, com variações de no mínimo 66,6% nos demais tratamentos e volumes utilizados. Por outro lado, o método ISO 11290 apresentou frequência de 100% em todos os tratamentos e volumes avaliados, indicando melhor desempenho na detecção de *L. monocytogenes* em queijo minas frescal, em comparação com as demais metodologias. Ao considerarmos o curto prazo de validade desse tipo de alimento, a Nested PCR pode ser considerada mais adequada e, a sua utilização como uma ferramenta de diagnóstico para os Serviços de Inspeção, deve ser recomendada tendo em vista a obtenção de resultados com maior rapidez e alta frequência na detecção de *L. monocytogenes*, indicando sensibilidade e especificidade suficientes para a sua aplicação.

**Palavras-chave:** *Listeria monocytogenes*; metodologia ISO 11290; Nested PCR.

## ABSTRACT

SOUZA, Stefania Marcia de Oliveira. Universidade de Brasília, Fevereiro, 2011. Standardization of a protocol for PCR and Nested PCR for detection of *Listeria monocytogenes* in Minas cheese.

The Minas fresh cheese is a fresh product characterized by having high moisture content making it extremely susceptible to contamination by various microorganisms, including *Listeria monocytogenes* and several outbreaks have been associated with consumption of fresh cheeses in the world. In this study, we performed a diagnostic for detection of *L. monocytogenes* using three different methodologies: ISO 11290, conventional PCR and Nested PCR, mass Minas fresh cheese type, artificially contaminated in different treatments. Samples of the mass of cheese were analyzed at three different moments: the day of manufacture (day 0), five days after production (Day 5) and ten days after manufacture (Day 10). For evaluation of molecular techniques were used volumes of 1mL, 5mL and 10 mL from the samples of fresh cheese. The results showed that the conventional PCR detected the presence of the pathogen in up to 33.3% of total samples, and only when they were analyzed at day 0, no detection occurred in other periods, indicating low sensitivity to other methodologies and nested PCR, showed the frequency of detection of 100% when using the volume of 1mL in performing the technique in the three study periods, variations of at least 66.6% in other treatments and volumes used. Moreover, the ISO 11290 method presented frequency of 100% in all treatments and packages evaluated, indicating better performance in detecting *L. monocytogenes* in fresh cheese in comparison with other methodologies. In considering the short shelf life of such food, nested PCR can be considered more appropriate, and its use as a diagnostic tool for Inspection Services, should be recommended in order to obtain results more quickly and high frequency in the detection of *L. monocytogenes*, showing sensitivity and specificity for its implementation.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; methodology ISO 11290; Nested PCR.

## Capítulo I

### 1. Introdução

Doenças associadas ao consumo de alimentos contaminados são conhecidas desde tempos remotos. Já em 2000 a.C. Moises determinou algumas leis sobre métodos de preparo dos alimentos, incluindo aqueles que poderiam ser ingeridos e os que deveriam ser rejeitados, bem como a importância da limpeza das mãos antes da ingestão (BRASIL, 2005). Entretanto, foi somente no século XIX, com as descobertas de Louis Pasteur, que ficou estabelecida a relação entre a presença de microrganismos e a deterioração dos alimentos, incluindo a capacidade destes de causarem doenças.

Essas enfermidades são causadas por meio da ingestão de alimentos ou água contaminados com agentes biológicos ou químicos, como por exemplo, vírus, príons, parasitas, produtos químicos e metais pesados, sendo que a maioria dos surtos é causada por vírus e bactérias (JAY, 2000). Casos dessas doenças ocorrem diariamente em todos os países, mas como as notificações não correspondem às ocorrências, a verdadeira dimensão do problema é desconhecida (WHO, 2009).

A emergência de *Listeria monocytogenes* como patógeno alimentar data de 1980, com a ocorrência de diversos surtos e casos esporádicos de listeriose ligados ao consumo de alimentos contaminados. Desde então, esse microrganismo tem provocado inúmeras discussões em todo o mundo e, conseqüentemente, estimulado pesquisadores a buscar respostas para as várias questões que têm surgido sobre a relação entre *Listeria* spp. e listeriose.

Diferentemente da maioria dos outros patógenos, *L. monocytogenes* apresenta características psicrófilas, podendo se desenvolver sob temperaturas de refrigeração, o que torna os alimentos “prontos para consumo” particularmente susceptíveis (EFSA, 2007). Esse patógeno é ubiqüitário, telúrico e pode ser isolado do solo, água, plantas e outras fontes ambientais. Resiste bem aos efeitos deletérios do congelamento, desidratação e calor e a diferentes fatores comuns em alimentos, como acidez, diferentes concentrações de cloreto de sódio, assim como a vários agentes antimicrobianos e substâncias químicas. Ainda, apresenta capacidade de se desenvolver em ambientes com baixas tensões de oxigênio devido a sua característica microaerófila (KABUKI, 2004).

A listeriose possui grande importância entre as doenças de origem alimentar e, embora exista uma margem de risco para todos os consumidores, em indivíduos pertencentes a grupos de risco como, gestantes, recém nascidos, idosos e imunocomprometidos, a sua na forma invasiva está associada com septicemia, encefalite, meningite, abortos e altos índices de mortalidade (ROCOURT, 1994; HOFER et al., 1998; HOFER et al., 1999). Em pessoas saudáveis, os relatos mais recentes de surto têm evidenciado casos de gastroenterite (KABUKI, 2004). Alguns estudos sugerem que 21% dos humanos sejam portadores dessa bactéria nos intestinos (RYSER et al., 1999).

A contaminação por *L. monocytogenes* nas indústrias de alimentos, é considerada atualmente um dos maiores problemas de segurança alimentar (HAMDI et al., 2007). Surtos e casos esporádicos têm sido relacionados a diferentes tipos de alimentos, como leite, queijos, molhos e derivados cárneos (SWAMINATHAN, 2001). Estudos realizados no Brasil comprovam a presença de *L. monocytogenes* em leites (SILVA et al., 2003), queijos (PIMENTA et al., 1999; SILVA et al., 2003; MARICATO et al., 2006; ZAFFARI et al., 2007) plantas de processamento e produtos cárneos (SILVA et al., 2004; BARROS et al., 2007).

O queijo tipo Minas frescal, de acordo com o Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade, é definido como um queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas, semi-gordo e de muita alta umidade (BRASIL, 1997,2004).

Nesse tipo de queijo, a alta umidade facilita o desenvolvimento microbiano tornando-o susceptível a deterioração. Assim, é importante a adoção de boas condições higiênicas durante a produção, que envolve fases de manipulação, e mesmo durante sua conservação. Especial atenção deve ser reservada para a higienização dos utensílios que são utilizados no processamento desse queijo, pois podem favorecer o acúmulo de matéria orgânica e formação de biofilmes, representando importante fonte de incorporação de microrganismos (TRAVANGIN, 2010).

Assim, diversos microrganismos podem estar presentes nesse tipo de queijo, inclusive os patógenos como *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157: H7 e *Clostridium botulinum* entre outros (FARKY & VEDAMUTHU, 2002; ROCHA et al., 2006; KOMATSU et al., 2010). A legislação brasileira atualmente em vigor exige, para o controle de qualidade desse produto, a pesquisa dos três primeiros patógenos citados (BRASIL, 1996, 2001).

As metodologias convencionais de diagnóstico microbiológico em alimentos utilizam testes morfológicos e bioquímicos para tipagem, subtipagem e identificação de gêneros, espécies e subespécies microbianas. Essas técnicas utilizam meios de cultura não-seletivos e seletivos, complementadas por testes bioquímicos diferenciais, na sua maioria de produção enzimática, usados em conjunto com testes sorológicos (GANDRA, 2008). Porém, as diversas etapas necessárias para a sua realização tornam essas metodologias, extremamente demoradas, de alto custo e com diversos pontos críticos que quando não são rigorosamente observados, aumentam a probabilidade de erros técnicos que comprometem os resultados obtidos.

Assim, nos anos 1980, com o avanço da biologia molecular, foram introduzidos métodos mais sensíveis e rápidos para detecção e caracterização de microrganismos. Isto permitiu que laboratórios divulgassem o sequenciamento genômico de espécies de *Listeria*. O conhecimento da estrutura gênica específica de *L. monocytogenes* tem possibilitado o entendimento dos seus mecanismos de ação, assim como sua identificação e diferenciação entre as espécies existentes.

Dentre os métodos de diagnóstico molecular, destaca-se a PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação de Polimerase em Cadeia), que tem sido amplamente

utilizada em microbiologia para ampliação do material genético de microrganismos. Isto permite que milhares de cópias sejam feitas a partir de uma única fita molde de DNA. Este método tem a vantagem de reduzir o tempo necessário para obtenção de resultados. Além disso, oferece maior sensibilidade e especificidade em relação aos métodos convencionais (GANDRA, 2008).

## 2. Justificativa

A ingestão de queijos em condições inadequadas para o consumo pode provocar graves problemas para o consumidor, e diversos estudos sobre a qualidade microbiológica de queijo do tipo Minas frescal, relatam a ocorrência de microrganismos patogênicos e deteriorantes, em contagens que excedem os limites estabelecidos pela legislação vigente no Brasil.

Considerando os aspectos da legislação brasileira, é obrigatória a pesquisa de *L. monocytogenes* nesse tipo de queijo, e os padrões microbiológicos estabelecidos determinam ausência em 25 gramas ( $n=5;c=0;m=0$ ). Todavia, o grau de caracterização, não tão específica, alcançado por métodos tradicionais de detecção e identificação, talvez conduza desnecessariamente ao descarte e/ou recolhimento de alimentos contaminados. Além disso, as técnicas microbiológicas convencionais são extremamente demoradas, de alto custo e exigem a realização de várias etapas até a sua conclusão, o que aumenta a probabilidade de erros técnicos.

Por outro lado, os métodos diagnósticos como a reação em cadeia da polimerase (PCR), são ferramentas valiosas na elucidação da cadeia epidemiológica de surtos, auxiliando na detecção de bactérias presentes em alimentos em um período reduzido, permitindo maior rapidez na obtenção de resultados finais e maior especificidade e sensibilidade.

Considerando a importância de *Listeria monocytogenes* em relação à segurança dos alimentos e por se tratar de um microrganismo potencialmente patogênico, torna-se necessária a padronização de metodologias de análise que sejam rápidas e confiáveis, para sua detecção em alimentos que permitam a adoção

de medidas também rápidas, por órgãos fiscalizadores quanto pelas indústrias laticinistas.

Assim, o presente estudo teve como objetivo padronizar uma técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) para detecção de *L. monocytogenes* em queijos de muito alta umidade.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

- Padronizar técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) para detecção de *L. monocytogenes* em queijos de muito alta umidade do tipo Minas frescal.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Comparar a especificidade e a sensibilidade da metodologia de diagnóstico microbiológico convencional para detecção de *L. monocytogenes* em queijos do tipo Minas frescal, com técnica de PCR convencional.
- Comparar a especificidade e a sensibilidade da metodologia de diagnóstico microbiológico convencional para detecção de *L. monocytogenes* em queijos do tipo Minas frescal, com técnica de Nested PCR.
- Verificar a performance das duas técnicas moleculares na detecção de *L. monocytogenes* em queijos do tipo Minas frescal, em diferentes períodos do prazo de validade do produto.

## 4. Revisão de literatura

### 4.1. Histórico

Segundo Corrêa & Corrêa (1992), os pesquisadores Munay, Webb e Swann em 1929, durante uma epizootia entre coelhos e cobaias de um biotério em Cambridge, isolaram microrganismos que causavam intensa monocitose, e nomearam o agente como *Bacterium monocytogenes*. Um ano mais tarde, na África do Sul, foi observada uma doença similar em uma espécie de roedor selvagem e, em homenagem a Lister, o agente etiológico foi denominado *Listerella hepatolytica*. Porém, considerando ser parecido com o agente isolado pelos outros autores ingleses, foi proposta a denominação de *Listerella monocytogenes*. Posteriormente, como havia um gênero vegetal assim denominado, o agente passou a chamar-se *Listeria monocytogenes*.

O gênero *Listeria* é classificado juntamente com os gêneros *Lactobacillus*, *Erysipelotrix*, *Brochothrix*, *Caryophanon* e *Renibacterium*. Além de *L. monocytogenes*, as outras espécies são: *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* e *L. murrayi*. A espécie *L. denitrificans* foi transferida para o gênero *Jonesia* (MANTILLA et al., 2007), mas apenas duas espécies são reconhecidamente patogênicas, assim *L. monocytogenes* que pode infectar uma variedade de espécies animais, incluindo o homem e *L. ivanovii* apresenta patogenicidade restrita aos ruminantes (ROCCOURT e COSSART, 1997; VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

### 4.2. Características fisiológicas

Os membros do gênero *Listeria* são definidos como bastonetes gram positivos, não esporulados, medem de 0,5 a 2,0 micrometros ( $\mu\text{m}$ ) de comprimento por 0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro. As células bacterianas podem apresentar-se formando pequenas correntes, são móveis em temperatura de 20 a 25°C e em ágar semi-sólido apresentam motilidade característica em forma de “guarda-chuva”, por possuírem flagelos peritríquios que possibilitam a mobilidade por movimentos rotatórios ou por

tombamento. São bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas, possuem metabolismo fermentativo para a glicose e hidrolisam a esculina. Desenvolve-se em temperatura entre 1 e 45°C, mas a faixa ótima de temperatura é entre 30 e 37°C (JAY, 2005), mas também apresentam características de psicotróficos pela capacidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração.

As espécies do gênero *Listeria* podem se desenvolver em ampla faixa de pH (de 4,1 até 9,6), mas, apresentam desenvolvimento ótimo entre 6 e 8, e são inativadas por tratamento térmico de pasteurização (SEELIGER & JONES, 1986). Além disso, esse microrganismo possui a capacidade de se adaptar e sobreviver em ambientes com alta concentração de sal (10% de NaCl) e de bile (10% a 40%), bem como, a capacidade de formação de biofilmes (JAY, 2005).

A diferenciação entre as espécies se dá pela sorotipificação, a qual se baseia nas diferenças sorológicas de polissacarídeos capsulares e que permitem a divisão dos microrganismos em sorovares diferentes. Atualmente 17 sorovares estão determinados e tal diferenciação é devida à grande quantidade de hospedeiros que podem carrear o patógeno (MELO, 2007).

### **4.3. Características Bioquímicas**

*Listeria* spp. é catalase positiva e oxidase negativa. Esses microrganismos são também D-xilose negativo, D-manitol negativo, L-ramnose positivo, metil - D-manosídio positivo, fermentam a glicose, vermelho de metila positivo, Voges Proskauer positivo, indol negativo, esculina positivo e não reduzem nitrato. As espécies de *Listeria* spp. que possuem atividade hemolítica (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*) expressam  $\beta$ -hemólise com a formação de zonas claras em ágar sangue porém, apenas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são consideradas como potencialmente patogênicas para humanos e animais (COCOLIN et al., 2002; KASNOWSK, 2004) como demonstrado no Quadro 1.

**Quadro 1.** Características bioquímicas de *Listeria* spp.

Características bioquímicas	Espécies					
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. grayi</i>
β-hemólise em ágar sangue	+	++	-	-	(+)	-
Redução do nitrato a nitrito	-	-	-	-	-	-
CAMP teste com <i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-	(+)	-
CAMP teste com <i>Rhodococcus equi</i>	-	+	-	-	-	-
D-manitol	-	-	-	-	-	+
L-rhamnose	+	-	V	V	-	-
D-xilose	-	+	-	+	+	-
A-metil D-manosídeo	+	-	+	+	V	NE

+ = reação positiva; ++ = reação positiva forte; (+) = reação positiva fraca; (-) = reação negativa, NE = não estabelecido

#### 4.4. Fatores de virulência e patogenicidade

A tipagem de *L. monocytogenes* é epidemiologicamente necessária para a identificação de fatores de virulência, que determinam a patogenicidade da cepa. Diversas técnicas de tipagem molecular classificam as características filogenéticas da bactéria em dois grandes grupos. A divisão I compreende as sorotipos 1/2a, 3b, 4b, 4d, e 4e; a divisão II compreende as sorotipos 1/2a, 1/2b, 3a, e 3c. Existe ainda um terceiro grupo menos comum de sorotipos 4a e 4c e, apesar de mais de 14 sorotipos terem sido descritos, apenas três (1/2a, 1/2b, 4b) estão relacionados com a ocorrência de doenças. Paradoxalmente, o sorotipo 1/2a é frequentemente isolado de alimentos e o 4b de epidemias (BORUCKI e CALL, 2003).

A forma mais comum de contaminação desta bactéria é pela ingestão de alimentos contaminados, portanto, o trato gastrointestinal é a principal porta de entrada para a bactéria no hospedeiro. Depois da ingestão do alimento contaminado, as células bacterianas conseguem resistir às diversidades do interior

estomacal e chegam ao intestino. Em poucos minutos, atravessam o epitélio intestinal e iniciam a reprodução intracelular. Aproximadamente em dois dias após sua penetração, as bactérias são carregadas pela linfa ou pela corrente sanguínea. A partir daí, o patógeno pode atingir os linfonodos, a placenta, o fígado e/ou o baço. Para que todo este processo ocorra, um eficiente mecanismo de invasão é realizado pela bactéria (MELO, 2007).

A primeira etapa da infecção deste microrganismo ocorre por uma associação com a membrana plasmática das células epiteliais do microvilos do hospedeiro. Em seguida, ocorre internalização, por fagocitose, e permanência no vacúolo. Na próxima etapa, cerca de 30 minutos após, *L. monocytogenes* é liberada da encapsulação do fagossoma por meio de lise da membrana fagossomal. No citoplasma ocorre multiplicação e polimerização da actina da célula hospedeira, formando os filamentos de actina. Cerca de 2 horas após a infecção, os filamentos de actina tornam-se organizados e orientados paralelamente, formando uma cauda longa (DESTRO, 1995).

Na etapa seguinte, o patógeno é transferido de uma célula infectada para uma célula vizinha não infectada e o contato é realizado entre a ponta da extensão do microrganismo com a cauda longa que a propulsiona à célula adjacente, formando um pseudópodo. Ocorre então uma fagocitose do pseudópodo que contém o microrganismo e parte de sua cauda pela célula adjacente (KABUKI, 2004). Um novo fagossoma contendo um vacúolo dentro de outro vacúolo é formado.

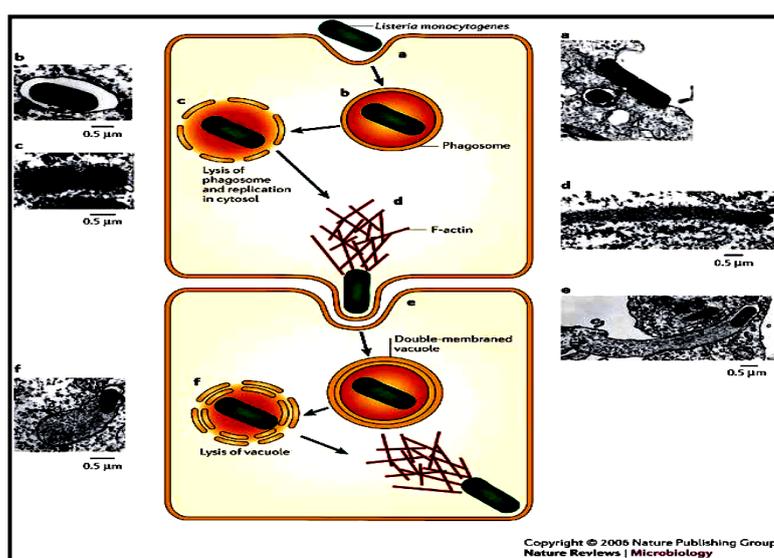
O patógeno fica interiorizado num vacúolo de dupla membrana. A bactéria escapa rapidamente (cerca de cinco minutos) deste vacúolo dissolvendo a dupla membrana, atinge o citoplasma e assim, inicia um novo ciclo de vida em uma nova célula. Desta maneira, ocorre multiplicação e disseminação de uma célula a outra sem deixar o citoplasma do hospedeiro (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Após romper a barreira intestinal, o microrganismo atinge, via linfa e sangue, o fígado e o baço onde normalmente a infecção cessa pela defesa específica do hospedeiro, em particular os neutrófilos (COSSART, 2002). Noventa por cento (90%) dos microrganismos são eliminados pelos macrófagos no fígado em seis horas. Os sobreviventes podem infectar os hepatócitos e levar à infecção sistêmica. Este processo infeccioso exige da bactéria a produção, e ação, de várias proteínas sobre

os componentes da célula hospedeira, o que completa seu ciclo de vida intracelular (IRETON e COSSART, 1997).

Para que o microrganismo atinja o interior da célula do hospedeiro, vários fatores de virulência participam do processo. A entrada em células de mamíferos é mediada por duas proteínas bacterianas de superfície, as internalinas *InIA* e *InIB*. O mecanismo de escape do fagossoma primário envolve a ação de uma toxina formadora de poros denominada de listeriolisina O (*LLO*) e de duas fosfolipases C fosfatidilinositol (*PI-PLC*). No citosol da célula hospedeira a proteína *ActA* é responsável pela formação da cauda de actina e pela motilidade intracelular e a dupla membrana do fagossoma secundário é rompida pela ação de *LLO* e uma lecitinase (*PC-PLC*) (CABANES et al., 2002). Esses fatores são regulados pelo gene *prfA* mas, seus mecanismos de termoregulação para expressão ainda não estão totalmente esclarecidos (ROCCOURT e COSSART, 1997).

Com isso, a patogênese de *L. monocytogenes* implica na internalização pelos fagócitos e pelas células não fagocíticas de diferentes órgão e tecidos. A estratégia de invasão célula a célula permite a disseminação do patógeno no interior dos tecidos de seus hospedeiros e a formação de focos infecciosos, ficando assim protegido das defesas do hospedeiro, como os anticorpos circulantes. Isto pode explicar porque os anticorpos não exercem um papel importante na recuperação a partir de uma infecção, ou proteção contra infecções secundárias (CABANES et al., 2002). A Figura 1 demonstra o mecanismo de invasão de *L.monocytogenes*.



**Figura 1:** Mecanismo de invasão de *Listeria monocytogenes*.

**Fonte:** Hamon et al., 2006.

#### **4.5. Listeriose em humanos**

De modo geral, a listeriose causa sintomas típicos de gripe em indivíduos imunocompetentes, porém, em recém nascidos e idosos pode causar meningite, septicemia e até levar a óbito. Segundo Schwab, Edelweiss e Graça (2004), *L. monocytogenes* penetra através da mucosa oral, atinge o nervo trigêmeo e o sistema nervoso central. No início da infecção, a listeriose, muitas vezes é confundida com um resfriado. Nesta fase, provoca febre e dores musculares. Uma vez atingido o sistema nervoso, podem ocorrer sintomas como cefaléia, torcicolo, confusão mental, perda de equilíbrio e convulsões. Conforme apontamentos da ANVISA (2005), a forma mais frequente de listeriose em adultos é a meningite. Em cerca de 20% destes casos podem formar-se abscessos cerebrais.

Posteriormente, a infecção pode propagar-se nos gânglios linfáticos, atingindo o sangue e as meninges. Em alguns casos pode afetar as válvulas cardíacas e levar à insuficiência cardíaca. Durante a gravidez a infecção pode causar aborto, parto prematuro e infecções no recém-nascido como bacteremia e meningite. Adultos com sistema imunológico em perfeito funcionamento podem apresentar gastroenterite febril aguda.

De acordo com o Ministério da Saúde (2006), a taxa de letalidade em recém-nascidos é de 30%; em adultos (sem gravidez) é de 35%; em torno de 11% para adultos com menos de 40 anos e 63% para adultos com mais de 60 anos. Quando ocorre septicemia, a taxa de letalidade é de até 50% e com meningite pode chegar a 70%. O documento informa que a dose infectiva por *L. monocytogenes* é desconhecida, mas, acredita-se que varia conforme a cepa e a susceptibilidade do indivíduo. Em casos contraídos através de leite pasteurizado ou cru afirma-se que em pessoas suscetíveis, menos de 1.000 organismos podem causar a doença.

#### **4.6. Listeriose em animais**

As infecções por *L. monocytogenes* têm sido relatadas em mais de 40 espécies de animais domésticos e silvestres. Abortos esporádicos têm sido atribuídos à infecção por *L. ivanovii*. A listeriose em ruminantes pode apresentar-se como encefalite, aborto, septicemia ou endoftalmite e geralmente apenas uma forma da

doença ocorre em determinado grupo de animais afetados. Relatos de casos de mastite listerial em bovinos são raros e geralmente ocorre na forma subclínica (GITTER et al., 1980; JENSEN et al., 1996). Em ovinos e caprinos, a listeriose manifesta-se frequentemente, sob a forma de alterações nervosas (encefalites), sobretudo nos adultos e nos jovens com menos de dois meses de idade. As formas abortivas são mais importantes nos bovinos (VAISSAIRE, 2000).

Pesquisas indicam maior ocorrência da doença no inverno e no início da primavera, período em que os animais se encontram mais deprimidos, devido ao estresse provocado pelo frio. Alguns sintomas clínicos normalmente observados incluem a depressão, inaptidão à mastigação e preensão, paralisia muscular facial, marcha em círculo e estrabismo (LOW e DONACHIE, 1997). Também pode ocorrer septicemia (sobretudo nos recém-nascidos com menos de oito dias), aborto (raramente associado a problemas nervosos), infecção peritonial e queratoconjuntivites (AI-DUGHAYM et al., 2001).

Em cães, gatos, eqüinos e suínos a listeriose pode provocar abortos além de encefalite (QUINN, 2005) e, a relação entre listeriose humana e animal apresenta evidências de transmissão por contato direto, com animais infectados ou pelo consumo de alimentos contaminados a partir de animais doentes (SAHIN & BEYTUT, 2006).

#### **4.7. Formas de transmissão**

A porta de entrada pode ser oral, ocular, respiratória e urogenital (BETRIU et al., 2001). Os casos de listeriose cutânea, conjuntivite e de listeriose pneumônica, têm sido verificados em indivíduos que tiveram contato direto com animais infectados (MCLAUHLIN e LOW, 1994). Também já foi descrita a via de contágio interpessoal, através de utensílios e manipulações hospitalares (termômetros, equipamento respiratório, solutos) (SCHLECH, 1991).

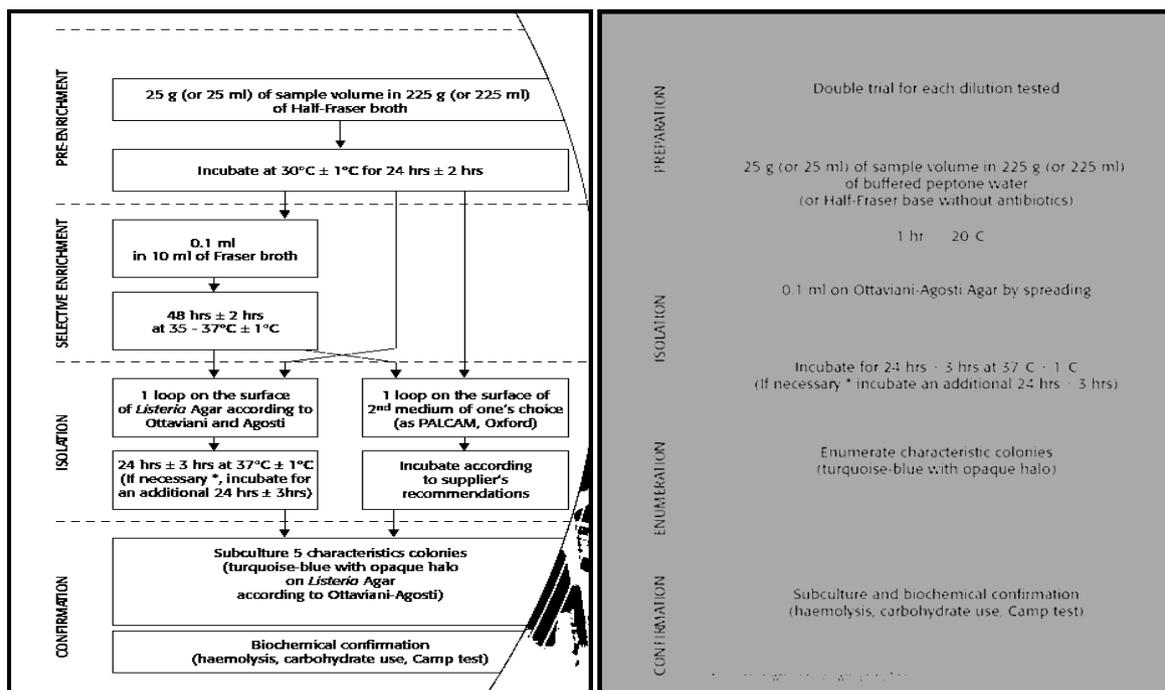
Dentre todas estas formas de transmissão, a contaminação alimentar é a principal (WHO Working Group, 1988) e, diversos alimentos, de origem animal e vegetal, têm sido relacionados a casos esporádicos e a surtos de listeriose no mundo.

## **4.8. Diagnóstico, tratamento e profilaxia**

### **4.8.1. Análises em alimentos**

As metodologias oficiais para análises microbiológicas utilizadas para detecção de *L. monocytogenes* em alimentos são preconizadas pela Food and Drug Administration (FDA, 1998) e pelo United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS, 1996), que são agências federais regulamentadoras de protocolos para análise de alimentos. O USDA-FSIS é o órgão responsável pela regulamentação de carnes, produtos cárneos, aves e ovos. A FDA é responsável pelos outros alimentos, incluindo pescado. Ambas as agências desenvolvem metodologias e estratégias de controle da qualidade em alimentos, que são adotadas em diversos países (KLIMA e MONTVILLE, 1995; SILVA et al., 1997).

Conforme a metodologia para amostragem, de acordo com a RDC 12, a coleta, o acondicionamento e o transporte para análise microbiológica de amostras de produtos alimentícios devem obedecer ao disposto pelo Codex Alimentarius; International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF); Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods e Standard Methods for the Examination of Dairy Products da American Public Health Association (APHA); Bacteriological Analytical Manual da Food and Drug Administration, editado por Association of Official Analytical Chemists (FDA/AOAC), em suas últimas edições e ou revisões, assim como outras metodologias internacionalmente reconhecidas, como a ISO (International Organization for Standardization), na qual é necessária a realização de etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivos, isolamento e confirmação da detecção do microrganismo (ISO 11290), conforme representado na Figura 2.



**Figura 2:** Protocolo para análise convencional ISO. (disponibilizado em: <http://biomerieux-industry.com>)

Para a identificação das espécies realiza-se uma série de testes bioquímicos baseados nas características do gênero (Quadro 1), além da verificação de reação de hemólise, motilidade a 25°C, coloração de Gram e catalase. Como alternativa apresentando maior praticidade na execução e rapidez nos resultados, podem ser utilizados *kits* comerciais como o sistema miniaturizado de identificação bioquímica API Listeria (bioMérieux) (FDA, 1998). *L. monocytogenes* é subdividida em treze sorotipos baseados em antígenos somáticos (O) e flagelares (H). A determinação antigênica dos sorotipos de amostras positivas para *L. monocytogenes* amplamente utilizada é a preconizada Seeliger e Höhne (1979), que utiliza antissoros somáticos e flagelares policlonais (ROCCOURT et al., 1989; OJENIYI et al., 1996; HOFER et al., 2000; HOFER e REIS, 2005).

#### 4.8.2. Análises clínicas e tratamento

O diagnóstico microbiológico clínico é feito com base nos sintomas e a partir do cultivo de amostras de sangue, de líquor ou de algum material biológico normalmente estéril. O isolamento deve ser feito preferencialmente em ágar sangue

para verificação da reação de  $\beta$ -hemólise e a identificação por provas bioquímicas, avaliando-se também a motilidade. O isolamento de *Listeria* spp. de sítios não estéreis como placenta e líquido amniótico, em associação com sintomas clínicos pode sugerir listeriose neonatal. Culturas de *L. monocytogenes* a partir de fezes não auxiliam no diagnóstico já que o microrganismo pode ser eliminado por portadores saudáveis. Da mesma forma, os testes sorológicos não contribuem para o diagnóstico da listeriose, porque a reação dos anticorpos pode não ser específica (HOF et al., 1991; JAY, 2000).

O ciclo intracelular e a capacidade de multiplicação em diversos tipos celulares conferem à *L. monocytogenes* durante o curso da infecção, uma proteção contra os mecanismos de defesa humoral e também contra a ação de antibióticos nos fluidos extracelulares. Portanto, durante a listeriose, o antibiótico deve ser transportado para o interior da célula hospedeira, por difusão passiva ou por transporte ativo (HOF et al., 1991).

Os antimicrobianos mais indicados no tratamento da listeriose são: tetraciclina, coumercina, rifampicina, cloranfenicol, eritromicina e ampicilina, sendo esta última adicionada de um antibiótico aminoglicosídeo (JAY, 2005). A associação de um aminoglicosídeo, como a gentamicina, com um beta lactâmico produz sinergismo, com efeito, bactericida, *in vivo*, sobre a bactéria e esta combinação tem sido a terapia de escolha. Para pacientes alérgicos aos beta-lactâmicos, o co-trimoxazol representa uma terapia alternativa (SCHUCHAT et al., 1991; HOF et al., 1991; KONEMAN, 2001).

#### **4.8.3. Medidas profiláticas**

As recomendações profiláticas são especialmente direcionadas para pessoas pertencentes aos grupos de risco como gestantes, idosos e imunocomprometidos, para evitar o consumo de produtos crus ou mal cozidos e relacionados a surtos de listeriose. Tanto a FDA, USDA-FSIS e os Centers for Disease Control and Prevention (CDC) têm conduzido estudos de avaliação de risco e estratégias para redução dos casos de listeriose, especialmente para as populações de risco (SCHUCHAT et al., 1991; FDA, 2008).

Na produção de alimentos o monitoramento constante dos produtos e das plantas de processamento, com a implantação de sistemas de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), tem sido obrigatório em países como Estados Unidos, Canadá, Nova Zelândia, Austrália e Brasil. O setor privado tem desenvolvido e aperfeiçoado métodos de gerenciamento de perigos e controle, particularmente em resposta aos incentivos e à constante e crescente regulação do mercado (UNNEVEHR e ROBERTS, 2002).

#### **4.9. Ocorrência de *L. monocytogenes* em alimentos e listeriose**

Diversos alimentos, crus e processados, podem apresentar contaminação por *L. monocytogenes*, proveniente de qualquer etapa da cadeia alimentar (ROCOURT e COSSART, 1997). De acordo com ARAUJO et al. (2002), o aumento de surtos de listeriose humana, a partir dos anos oitenta, e a possível relação com alimentos contaminados, vem preocupando as autoridades sanitárias. Segundo estes autores, são comuns os casos individuais esporádicos de listeriose, provocados pela ingestão de produtos tais como, queijo macio, carne de frango mal cozida, salsicha inadequadamente reaquecida e alimentos provenientes de delicatessen.

Embora os dados estatísticos brasileiros sejam insuficientes, acredita-se que a incidência de doenças microbianas de origem alimentar no Brasil seja bastante elevada. Mesmo em países desenvolvidos, nos quais o abastecimento de gêneros alimentícios é considerado seguro do ponto de vista de higiene e saúde pública, a ocorrência de doenças desta natureza é significativa e vem aumentando, apesar dos avanços tecnológicos nas áreas de produção e controle de alimentos (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

A listeriose humana é uma doença que, atualmente, só está documentada nos países mais desenvolvidos, sendo a sua incidência desconhecida ou muito baixa na África, Ásia e América do Sul, assim como em alguns países europeus onde a doença não é notificada, como ocorre em Portugal. E, ainda não há dados para comprovar se as diferenças verificadas nas incidências se devem a variações nos hábitos alimentares, à variabilidade na susceptibilidade dos hospedeiros, às

particularidades nas formas de processamento e/ou ao armazenamento de alimentos (ROCOURT e COSSART, 1997).

A maioria dos surtos descritos, até o presente, foram relacionados com alimentos processados industrialmente, e em alguns deles verificou-se a existência de falhas nos sistemas de controle estabelecidos para evitar a contaminação dos produtos (ROCOURT, 1996; FDA/ USDA, 2001). Os alimentos considerados de alto risco são os do tipo “prontos para comer”, e armazenados a temperaturas de refrigeração durante longos períodos de tempo, o que permite a multiplicação de *Listeria* spp. (PINNER et al., 1992; SCHUCHAT et al., 1992; MCLAUCHLIN, 1996; ROCOURT, 1996; RYSER, 1999).

Por se tratar de uma bactéria ambiental, *L. monocytogenes* está presente numa infinidade de alimentos: produtos cárneos (FARBER et al., 1989; DESTRO et al., 1991; FURLANETTO et al., 1996; KABUKI, 1997., 1996; BARROS et al., 2007), vegetais (WONG et al., 1990; PORTO & EIROA, 2001), pescados (DESTRO) 1995; JOHANSSON et al., 1999; ROCOURT, 2001) produtos lácteos (FARBER et al., 1989; DESTRO et al., 1991; MOURA et al., 1993), alimentos processados prontos para consumo (GOMBAS et al., 2003) e equipamentos e ambientes processadores de alimentos (BARROS et al., 2004).

O primeiro surto de listeriose de origem alimentar comprovado na América do Norte, aconteceu em 1981 em Nova Escócia, Canadá, com 41 doentes e 11 mortes. Este surto foi relacionado com a ingestão de salada contendo repolho contaminado a partir de adubo *in natura* proveniente de ovinos (SCHLECH et al., 1983). Em 1983 ocorreu um surto em Boston, nos Estados Unidos, (49 casos e 14 mortes) e epidemiologicamente ligado ao leite pasteurizado, mas o microrganismo não foi isolado do produto (FLEMING et al., 1985). Em 1985 um grande surto ocorreu no sul da Califórnia, Estados Unidos, (142 casos e 48 mortes) e foi causado por um tipo de queijo mole, denominado *Mexican-style*, produzido a partir de leite cru ou provenientes de processo de pasteurização inadequada (LINNAN et al., 1988) (Quadro 2).

Após este período, o número de casos de listeriose declinou em alguns países, tendo-se associado esta redução à eficácia das medidas tomadas pela indústria

alimentar e ainda às recomendações efetuadas aos grupos de risco (ROBERTS, 1994; TAPPERO et al., 1995; GOULET et al., 2001). Entretanto, no final dos anos 1990, voltaram a ocorrer outros grandes surtos de listeriose humana, associados ao consumo de alimentos, nos EUA (ANÔNIMO, 1999; ANÔNIMO, 2000a; ANÔNIMO, 2001), na França (DE VALK et al., 2001), Itália (AURELI et al., 2000) e na Finlândia (MAIJALA et al., 2001). Nos EUA, as estimativas associam a listeriose ao maior risco de hospitalizações e à segunda maior causa identificada de morte por doença de origem alimentar (MEAD et al., 1999; ANÔNIMO, 2000b).

Em pesquisa realizada por MENA et al. (2004), vários tipos de produtos alimentícios foram analisados quanto a presença de *L. monocytogenes* em Portugal. Das 1035 amostras (leite, carne, peixes crus, e alimento termicamente processados e fermentados), 72 (7,0%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Das 17 amostras de carne bovina crua, 3 (17,7%) foram positivas para *L. monocytogenes*. A carne de frango crua obteve maior número de amostras positivas (60%) comparando-se com os alimentos analisados.

**Quadro 2.** Surtos e casos esporádicos suspeitos e comprovados de listeriose de origem alimentar (JAY, 2000).

<b>Ano</b>	<b>Origem</b>	<b>Casos/Mortes</b>	<b>Localização</b>
1953	Leite cru	2/1	Alemanha
1959	Carne bovina/frango*	4/2	Suécia
1960-61	Vários/desconhecido	81/?	Alemanha
1966	Leite/derivados	279/109	Alemanha
1979	Vegetais/leite <sup>†</sup>	23/3	Boston
1980	Mariscos	22/6	Nova Zelândia
1981	Repolho	41/18	Canadá
1983	Leite pasteurizado	49/14	Boston
1983-87	Queijo tipo <i>Vacherin</i>	122/34	Suíça
1985	Queijo Mexican <i>style</i>	142/48	Califórnia
1986-87	Vegetais <sup>†</sup>	36/16	Filadélfia
1987-89	Patê	366/63	Reino Unido
1987	Queijo	1	Reino Unido
1988	Queijo leite cabra	1	Reino Unido
1988	Frango assado	1	Reino Unido
1988	Frango assado	2	Reino Unido
1988	Embutido de peru	1	Oklahoma
1989	Embutido de porco	1	Itália
1988	Alfafa	1	Canadá
1989	Cogumelos salgados	1	Finlândia
1989	Camarão	9/1	Estados Unidos
1989	Embutido de porco	1	Itália
1990	Leite cru	1	Vermont
1990	Embutido de porco	1	Itália
1990	Patê	11/6	Austrália
1991	Mexilhão defumado	3/0	Austrália
1992	Mexilhão defumado	4/2	Nova Zelândia
1992	Carne de ovinos	1	Canadá
1992	Língua de porco	279/85	França
1993	Filetes de porco	39/0	França
1994	Achocolatado	52/0	Estados Unidos
1994	Azeitonas em conserva	1	Itália
1995	Queijo <i>Brie</i>	17/0	França
1998-99	Salsicha tipo hot-dog	101/21	Estados Unidos

\* Suspeito

<sup>†</sup> Epidemiologicamente relacionados(microrganismo não detectado)

Apesar de ainda não ter sido notificado nenhum surto de listeriose no Brasil, é comum o isolamento de *L. monocytogenes* em alimentos disponíveis à população. Os estudos sobre a ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos tipo Minas frescal, têm revelado grande variação, que é explicada pelas diferentes metodologias utilizadas na detecção da bactéria, nas diferenças entre as amostras devido ao processamento e pelo uso de leite cru ou pasteurizado. Ainda, a maior ocorrência de *L. monocytogenes* em queijo Minas frescal artesanal do que industrializado segundo constatado por Silva et al. (1998) e Vieira (2000), se deve ao uso de leite cru no processamento artesanal.

Loncarevic et al. (1995) observaram que queijos mole e semi-mole produzidos com leite cru apresentavam-se mais freqüentemente contaminados com *L. monocytogenes* do que os queijos preparados com leite tratado termicamente. Silva et al. (2002), analisaram amostras de matéria-prima, produto final e amostras ambientais de planta de processamento de uma indústria de queijos Minas Frescal no estado da Bahia, e encontraram 11,4% de *Listeria* spp. e 2,9% de *L. monocytogenes* nas amostras analisadas.

A incidência de *Listeria monocytogenes* em queijos macios e similares, relatada em diversas pesquisas, tem variado de 0,50% a 46% (ROCCOURT, 2001; GUERRA et al., 2001; MANFREDA et al., 2005; PINTADO et al., 2005; COLAK et al., 2007). Souza, (2002) detectou 1,40% de *L. monocytogenes* em 70 amostras de queijo artesanal azedo comercializado em Fortaleza, CE, enquanto Ramos e Costa (2003) detectaram em 1,70% de amostras, do mesmo tipo de queijo, comercializadas em Manaus, AM. Oliveira (1993) detectou 2,00% de *L. monocytogenes* em queijo Minas no segmento de varejo de Goiânia, GO. Esta percentagem foi também encontrada por Schwab, em 1994, em amostras de queijo colonial vendidas em Porto Alegre. Destro et al., (1991) isolaram *L. monocytogenes* em 10% das amostras de queijo Minas, enquanto Silva et al., (1998) encontraram incidência mais elevada (41,20%) de *L. monocytogenes* em queijo Minas artesanal.

Entretanto, outros autores como Casarotti et al. (1994) e Feitosa et al. (2003), não detectaram este microrganismo em amostras de queijo Minas comercializado em Piracicaba, SP, nem em queijo de leite e manteiga produzidos no Estado de Rio Grande do Norte. Silva et al. (2004) coletaram 218 amostras de queijos ao longo da

linha de produção e do ambiente de duas fábricas de queijos Minas frescal e 13 isolados de *Listeria* spp. foram encontrados nas amostras, das quais, 70% foram positivas para *L. innocua* e 15% para *L. monocytogenes*.

Nos últimos vinte anos, mais de uma dezena e meia de surtos têm sido relatados em diversos países, sendo a maioria relacionada a queijos moles (Quadro 3).

**Quadro 3.** Ocorrência de *L. monocytogenes* isolada de queijos em diversos países

<b>Tipo de Queijo</b>	<b>Nº de amostras</b>	<b>País</b>	<b>Referência</b>
Queijo Minas frescal	2/20 (10,0)	Brasil	Destro <i>et al</i> (1991)
Queijo frescal	2/30(6,7)	Brasil	Furlanetto <i>et al</i> (1996)
Queijo Minas Frescal	7/17(41,1)	Brasil	Silva <i>et al</i> (1998)
Queijo Macio	14/73(19,0)	Dinamarca	Norrung <i>et al</i> (1999)
Queijo panela	3/20(15,0)	Estados Unidos	Saltijiral <i>et al</i> (1999)
Queijos macios	23/374(6,0)	Europa	Rudolf e Scherer (2001)
Queijo macio	20/256(0,8)	Chile	Cordano; Roucort(2001)
Queijos	2/74(2,7)	Bélgica	De Réu <i>et al</i> (2002)
Queijo de Coalho	1/17(5,9)	Brasil	Leite <i>et al</i> (2002)
Queijo de Coalho	1/43(2,3)	Brasil	Borges <i>et al</i> (2003)
Queijo de Coalho	16/84(19,0)	Brasil	Branco <i>et al</i> (2009)
Queijo tipo hispânico	3/74	Estados Unidos	Gombas <i>et al</i> (2003)
Queijo de Coalho	1/58(1,7)	Brasil	Ramos e Costa (2003)
Queijo fresco	3/74(4,0)	Peru	Espinoza <i>et al</i> (2004)
Queijo/Leite cru	6/37(1,6)	Portugal	Mena <i>et al</i> (2004)
Queijo fresco	2/50 (4,0)	Portugal	Mena <i>et al</i> (2004)
Queijo fresco	7/111(6,3)	Estados Unidos	Kabuki <i>et al</i> (2004)
Queijo macio	29/63(46,0)	Portugal	Pintado <i>et al</i> (2004)
Queijo macio	1/99(1)	Itália	Vitas <i>et al</i> (2004)
Queijo de Coalho	7/127(5,5)	Brasil	Duarte <i>et al</i> (2005)
Queijo artesal	15/123(12,2)	Japão	Makino <i>et al</i> (2005)
Queijo gorgonzola	35/1656(2,1)	Itália	Manfreda <i>et al</i> (2005)
Queijo de Coalho	2/70(2,8)	Brasil	Souza <i>et al</i> (2006)
Leite e queijo de coalho	0/140(0,0)	Brasil	Borges <i>et al</i> (2006)
Leite e produtos Lácteos	80/2256(3,5)	Hungria	Kis <i>et al</i> (2006)
Ricota	3/45(6,7)	Brasil	Esper (2006)
Queijo turkish	2/157(2,3)	Turquia	Augyn;Pehlivanlar(2006)
Queijo minas frescal	3/93(3,2)	Brasil	Carvalho <i>et al</i> (2007)
Ricota	3/80(3,7)	Brasil	Zaffari <i>et al</i> (2007)
Queijo tulum	12/250(4,8)	Turquia	Colak <i>et al</i> (2007)
Queijo macios/semi	6/90(6,7)	Brasil	Abrahão <i>et al</i> (2008)

Fonte: BORGES *et al.*, 2009.

## 5. CONTROLE E SEGURANÇA ALIMENTAR

Nos Estados Unidos, até a década de 1950, a indústria de alimentos contava apenas com a análise laboratorial dos lotes produzidos para fins de controle de segurança e qualidade. Assim, um lote era preparado e, caso a análise demonstrasse que apresentava as condições desejadas, era liberado; se não era retido. Tentando melhorar, a indústria de alimentos adaptou a Boas Práticas (BP) da indústria farmacêutica, dando um grande passo para melhorar e dinamizar a produção de alimentos seguros e de qualidade. Com as Boas Práticas de Fabricação (BPF), começou-se a controlar, segundo normas estabelecidas, a água, as contaminações cruzadas, as pragas, a higiene, o comportamento do manipulador, a higienização das superfícies, o fluxo do processo e outros itens (SENAI, 2005).

No Brasil, entre as décadas de 1960 e 1970 as BP já eram exigidas, pelo Decreto Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969, que instituiu normas básicas sobre alimentos. Porém, a metodologia de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), só foi introduzida no final da década 1990 por meio da Portaria nº 326 do Serviço de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, de 30 de Julho de 1997, que aprova o Regulamento Técnico de Identidade e qualidade de queijo Minas frescal.

Na produção de alimentos o monitoramento constante dos produtos e das plantas de processamento, com a implantação de sistemas de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), tem sido obrigatório em países como Estados Unidos, Canadá, Nova Zelândia e Austrália. O setor privado tem desenvolvido e aperfeiçoado métodos de gerenciamento de perigos e controle, particularmente em resposta aos incentivos e à constante e crescente regulação do mercado (UNNEVEHR e ROBERTS, 2002).

A diretiva da Comunidade Européia sobre leite e derivados determina o padrão de “tolerância zero” para queijos moles e ausência de *L. monocytogenes* em 1gr dos outros produtos. Na Grã Bretanha determinou-se padrões para alguns alimentos prontos para o consumo estabelecendo grupos baseados no número de *L. monocytogenes* presentes. Quando o microrganismo não é detectado em 25 g. o alimento é considerado satisfatório; quando em contagens de 100 a 1000 Unidades

Formadoras de Colônias (UFC)/25g é considerado insatisfatório e em contagens acima de 1000UFC/25g, o alimento é considerado inaceitável (JAY, 2000).

O governo dos Estados Unidos tem a política mais rígida considerando *L. monocytogenes* um “adulterante” e isto significa que, quando é detectada a presença do patógeno em um alimento o mesmo é considerado adulterado e, portanto sujeito a *recall* e/ou apreensão. É a política conhecida como “tolerância zero” determinada pela ausência do patógeno em 25g de amostra (KLIMA e MONTVILLE, 1995; JAY, 2000).

Em dois de janeiro de 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou a Resolução da Diretoria Colegiada nº 12 e, em 1996, a Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), do Ministério da Agricultura aprovou a Portaria nº146. Essas legislações estabelecem como critério microbiológico, a ausência de *L. monocytogenes* em 25 g (n=5; c=0; m=0) em queijos de muita alta umidade, como o queijo tipo Minas frescal (BRASIL, 1996; ANVISA, 2005).

## **6. SITUAÇÃO ATUAL**

A dose mínima infectante de *L. monocytogenes* para humanos é pouco conhecida, mas alguns trabalhos relatam que o patógeno apresenta dose infectante muito baixa, possibilitando que a simples contaminação e a ausência de alguma etapa do processo que elimine o microrganismo, possam causar a doença (OLIVEIRA et al., 2010).

O United States Department of Health and Humans Services Healthy People, 2010, objetiva reduzir a incidência de casos de listeriose, até o final desta década, para 2,5 casos em um milhão de pessoas. De acordo com dados da Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), a incidência de casos confirmados de listeriose em 2004 foi de 2,7 em um milhão de pessoas, o que representou um decréscimo de 40% no período compreendido entre 1996 a 2004.

Em 2004, foram confirmados 15.806 casos de doenças causadas por alimentos contaminados nas regiões abrangidas pela FoodNet e destes, 120 foram casos de listeriose, responsável pelo maior índice de hospitalizações (91%) e pela

maior taxa de mortalidade (17%). Esses dados confirmam que, apesar da baixa incidência, essa enfermidade apresenta uma alta taxa de mortalidade, quando comparada com outras DTAs como a salmonelose e a campilobacteriose (CDC, 2006).

## **7. UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES**

No Brasil, as técnicas oficiais para análise microbiológica de alimentos de origem animal, incluindo pesquisa de *L. monocytogenes*, são estabelecidas pela Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. A análise microbiológica convencional para pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos está baseada em etapas de enriquecimento, seguidas da seleção de colônias típicas em meios de culturas seletivos, que devem ser submetidas à avaliações morfológicas, bioquímicas e sorológicas para confirmação de sua presença. (BERESFORD et al., 2001; DONELLY E RYSER, 2001; BRASIL, 2003; SILVA et al., 2007).

Apesar dos métodos oficiais serem considerados confiáveis para detecção de microrganismos em alimentos, são extremamente demorados, laboriosos e com várias etapas consideradas como pontos críticos. Além disso, fatores ambientais, variações na expressão gênica dos microrganismos podem afetar a especificidade dos testes bioquímicos. Outra situação observada nas técnicas convencionais é a não detecção de células viáveis não-cultiváveis (MALORNY et al., 2003; MARIN et al., 2006).

A busca por métodos rápidos e eficazes para detecção de patógenos é uma área de pesquisa crescente e, essencial para satisfazer a necessidade de agilidade que o mercado atual exige. Nas últimas décadas, verificou-se aumento significativo no desenvolvimento de técnicas moleculares para a detecção, identificação e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. Avanços, nos estudos de biologia molecular, propiciaram o desenvolvimento e o emprego de vários métodos de tipagem molecular (DESTRO, 1995).

As técnicas moleculares têm aplicação direta na detecção e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. Dentre essas, destacam-se as fundamentadas

na amplificação de seqüências do DNA pela reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) (BOER E BEUMER, 1999; MALORNY et al., 2003). A PCR é uma técnica altamente sensível, por meio da qual, pequenas quantidades de seqüências de DNA ou RNA específicas podem ser enzimaticamente amplificadas até que sejam obtidos milhões de cópias da seqüência alvos (KONEMAM et al., 2001).

A introdução da PCR, em diagnóstico microbiano, estabeleceu uma alternativa viável aos métodos tradicionais de cultura (MARLONY et al., 2003). Esta técnica apresenta diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, como maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade, especificidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com bactérias que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados (BUSH e NITSCHKO, 1999).

Os principais obstáculos à sua implementação na rotina laboratorial são a incapacidade do método em diferenciar entre células vivas e mortas, a presença de inibidores de enzima polimerase em alguns alimentos, o alto investimento em equipamentos e reagentes e a falta de aprovação, padronização e regulamentação por parte dos órgãos oficiais (MARLONY et al., 2003). Outra desvantagem está na complexidade do método, principalmente para ser utilizado em análises de rotina, apesar de que o recente desenvolvimento de kits básicos em PCR têm facilitado a sua utilização e difusão (BOER e BEUMER, 1999).

Diversos pesquisadores têm descrito a utilização de técnicas fundamentadas em PCR na detecção direta de microrganismos em alimentos (ROSSEN et al., 1991; JENSEN et al., 1994; DESTRO, 1995; GANDRA et al., 2008). Com o intuito de melhorar sua eficiência, várias modificações da técnica de PCR básica foram descritas (KONEMAN et al., 2001), dentre elas RADP (Random Amplified Polymorphic DNA), RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR), Nested PCR, Multiplex PCR, PCR ribotipagem, RFLP-PCR (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism) e PCR em tempo real dentre outros (GANDRA et al., 2008).

Dentre estas variações a Nested PCR é bastante utilizada para diagnósticos diversos. Nesta metodologia um segundo ciclo de amplificação é realizado,

utilizando como alvo o produto de uma primeira amplificação. Para isso são utilizados na primeira fase um par de primers e um segundo par de primers para uma segunda amplificação, localizados internamente a sequência previamente amplificada (ESTRADA et al., 2007).

A sensibilidade e especificidade do DNA e amplificação do RNA pode ser aumentado dramaticamente usando o método de nested PCR. A especificidade é particularmente reforçada porque essa técnica quase sempre elimina qualquer produtos de amplificação não-específica. Isso porque, após a primeira rodada de PCR dos produtos não-específicos não são susceptíveis de ser suficientemente complementar os primers nested para ser capaz de servir como modelo para a ampliados posteriormente. Assim, a seqüência alvo desejado é preferencialmente amplificado. No entanto, o aumento do risco de contaminação é uma desvantagem desta tecnica (KABUKI, 2004).

Apesar de serem comprovadamente eficientes, muito verificados e validados, os métodos rápidos ainda são utilizados como testes presuntivos no início das análises, no intuito de agilizar a liberação de lotes na indústria quando os resultados são indicativos de ausência de patógenos. Em caso de presença de patógeno, o método convencional deve ser utilizado para confirmação. A maior especificidade da PCR, comparado com os métodos microbiológicos convencionais, é conferido pelo fato de se detectar uma região única de um genoma bacteriano. A ocorrência de falso positivo é minimizada, considerando que a probabilidade da ligação do oligonucleotídeos em regiões não específicas é um evento raro (SAROJ et al., 2008).

A padronização de técnicas moleculares para pesquisa de patógenos é uma ferramenta útil para se indicar contaminação de alimentos de forma rápida e eficiente, o que contribui para melhoria do sistema de fiscalização de produtos de origem animal.

## **8. CONCLUSÃO**

A ocorrência de listeriose é resultado de múltiplas interações de vários fatores. A necessidade de se obter alimentos mais seguros, com o intuito de diminuir

a incidência de doenças de origem alimentar, é uma preocupação constante de órgãos vinculados à saúde pública.

Com o surgimento de casos de listeriose associados ao consumo de alimentos, observou-se a necessidade de melhorar os métodos analíticos para detecção do patógeno em produtos alimentícios, que se confirma com o elevado número de pesquisas realizadas envolvendo *L. monocytogenes*, principalmente em países desenvolvidos.

Elaborar técnicas eficientes para detecção do microrganismo demanda intensa pesquisa que envolve diversos profissionais como, microbiologistas, biólogos moleculares, sanitaristas, epidemiologistas além de órgãos públicos e privados, dentre outros.

O aumento da população mundial e o conseqüente aumento do consumo de alimentos, requerem cuidados mais efetivos e eficientes na busca de alimentos seguros, o que proporciona uma real diminuição de casos de doenças de origem alimentar muitas vezes não diagnosticados adequadamente.

## 9. Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Principais Síndromes Infeciosas. Brasília: **Editora Anvisa**, 2005.

AL-DUGHAYM, A. M.; ELMULA, A. F.; MOHAMED, G. E.; HEGAZY, A. A.; RADWAN, Y. A.; HOUSAWI, F. M. E GAMEEL, A. A. First Report of an Outbreak of Ovine Septicaemic Listeriosis in Saudi Arabia. **Rev. Sci. Tech.**, v. 20, p. 777-783, 2001.

ANÔNIMO. Multistate outbreak of listeriosis – United States, 1998-9. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.47, p. 1117- 1181, 1999.

ANÔNIMO. Multistate outbreak of listeriosis - United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.49, p.1129-1130, 2000a.

ANÔNIMO. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Foodborne Illness- Selected Sites, United States, 1999. **CDC Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 49, p. 201-205, 2000b.

- ANÔNIMO. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese - North Carolina, October 2000-January. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v.50, p. 560-562, 2001.
- ARAÚJO, P. C. C. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em Produtos de Carne de Peru Comercializados na Cidade de Niterói-RJ-Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*. Porto Alegre: UFRS, p.19-24, 2002.
- AURELI, P.; FIORUCCI, G. C.; CAROLI, D.; MARCHIARO, G.; NOVARA, O.; LEONE, L. E SALMASO, S. An outbreak of Febrile Gastroenteritis Associated with Corn Contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N. Engl. J. Med.*, v. 342, p.1236-1241, 2000.
- BARROS M.A.F. *Listeria monocytogenes*: Ocorrência na carne bovina, identificação dos principais pontos de contaminação em plantas de processamento e relação com a microbiota acompanhante. **Tese de Doutorado**. UEL, 2005.
- BARROS, M.A.F.; NERO, L.A.; SILVA, L.C.; OVIDIO, L.; MONTEIRO, F.A.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; HOFER, E.; BELOTI, V. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. *Meat Science*, v.76, p. 591-596, 2007.
- BERESFORD, M. R.; ANDREWS, P.W. AND SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology*, v. 90, p.1000-1005, 2001.
- BETRIU, C.; FUENTEMILLA, S.; MÉNDEZ, R.; PICAZO, J. J. E GARCÍA-SÁNCHEZ, J. Endophthalmitis Caused by *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, p. 2742-2744, 2001.
- BOER, E.; BEUMER, R. R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 50, p. 119-130, 1999.
- BORGES, M.F.; ANDRADE, A.P.C.; ARCURI, E.F.; KABUKI, D.Y.; KUAYE, A.Y. *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos. **Embrapa Agroindústria tropical**. ISSN 1677-1915, junho, fortaleza -CE, 2009.

BORUCKI, M.K.; E CALL, D.R. *Listeria monocytogenes* sorotipo Identificação por PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.41 p. 5537-5540, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água. Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo**, Brasília, DF, 18/08/2003, Seção I, p.14-50, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 04 de 01/03/2004. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade em Queijo Minas Frescal – Alteração na “Classificação”. **Diário Oficial da União**. 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura. REGULAMENTO Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Portaria n º 146, de 07/03/1996. **Oficial Diário da República Federativa do Brasil**, Brasília, 11/03/1996, seção 1, p. 3977-3978,1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária Portaria nº 352 de 04/09/1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União**, 08/09/1997, seção 1, p.196-197, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde (2005) Disponível em <http://www.saude.gov.br>. Acessado em 17.10.2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico de princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 jan. Seção 1, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://www.saude.gov.br>. Acessado em 13 de abril de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Análise**

**epidemiológica dos Surto de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil.** 2008. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos\\_dta\\_15.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf). Acessado em 13/5/2010.

BUSH, U.; NITSCHKO, H. Methods for the differentiation of microorganisms. **J. Chromatography**, v. 722, p. 263-278, 1999.

CABANES, D.; DEHOUX, P.; DUSSURGET, O.; FRANGEUL, L.; COSSART, P. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. **Trends in Microbiology**, v.10, p. 238-245, 2002.

CASAROTTI, V. T.; GALLO, C. R.; CAMARGO, R. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo minas frescal comercializados em Piracicaba-SP. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 44, p. 158-163, 1994.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION FoodNet Dados preliminares da incidência de infecção por patógenos transmitidos normalmente através da alimentação-10 estados. **MMWR Morb Mortal Wkly** 2007, v. 56, p. 336-339, 2006.

COCOLIN, L.; RANTSIOU, K.; IACUMIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. Direct identification in foods samples of *Listeria* spp. And *Listeria monocytogenes* by molecular methods. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 68 n. 12, 2002.

COLAK, H.; HAMPIKYAN, H.; ULUSOY, B. E BARIS BINGOL, E. Presence of *Listeria monocytogenes* in Turkish style fermented sausage. **Food Control**, v. 18, p. 30-32, 2007.

CORRÊA, W.M. E CORRÊA, C.N.M. Listeriose. *Enfermidades Infeciosas dos Mamíferos Domésticos*. 2 ed. Rio de Janeiro: **MEDSI**, cap. 24, p. 367- 373, 1992.

COSSART, P. Molecular e base celular da infecção por *Listeria monocytogenes*: um panorama. **Int. J. Méd. Microbiol.**, v. 291, p. 401-92, 2002.

- DE VALK, H.; VAILLANT, V.; JACQUET, C.; ROCOURT, J.; QUERREC, L.E.F.; STAINER, F.; QUELQUEJEU, N.; PIERRE, O.; PIERRE, V.; DESENCLOS, J.C.; E GOULET, V. Two Consecutive Nationwide Outbreaks of Listeriosis in France, October 1999- February 2000. **Am. J. Epidemiol.**, v.154, p. 944-950, 2001.
- DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes* em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado. 142f. **Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)** - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1995.
- DESTRO, M.T.; SERRANO, A.M.; KABUKI, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, v.2, p. 110-112, 1991.
- EFSA - European Food Safety Authority (2007). **The EFSA Journal: The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006.** versão electrónica. Acedido em 16 setembro, 2010 em: [http://www.efsa.europa.eu/EFSA/DocumentSet/Zoon\\_report\\_2006\\_en,0.pdf](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/DocumentSet/Zoon_report_2006_en,0.pdf)
- ESTRADA, C.S.M.L; VELASQUES, L. DEL C.; GENARO,S.D. AND GUZMAN,S.M.S. Comparison of DNA extration method for pathogenic *Yersinia enterocolitica* detection from meat food by Nested PCR. v.40, ISSUES p.637-642, **Food Research Int.** 2007.
- FARBER, J.M.; GENDEL, S.M.; TYLER, K.D.; BOERLIN, P.; LANDRY, W.L.; FRITSCHER, S.J.; BARRETT, T.J. Tipagem molecular e diferenciação. **Compêndio de métodos de análise microbiológica de alimentos. APHA,** Washington, p.127-158, 2001.
- FARBER, J. M.; SANDERS, G. W.; JOHNSTON, M.A. A Survey of various foods for the present of Listerias species. **Journal of Food Protection.** v. 52, n.7, p. 456-458, 1989.
- FARKYE, N.Y.; VEDAMUTHU, E.R. Microbiology of soft cheese. **Dairy Microbiology Handbook.** Third Edition, (Ed. Robison, R. K) New York, Wiley Interscience, p.479-514, 2002.

- FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological analytical Manual, 8<sup>o</sup> ed. Gaithersburg: **AOAC International**, 1998.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Draft Compliance Policy Guide Sec. 555.320 — *Listeria monocytogenes*. **Federal Register**. v. 73, p. 7293–7298, 2008.
- FDA/USDA. Draft Assessment of the Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods, 2001. <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmrisk.html>.
- FEITOSA, T.; BORGES, M. de F.; NASSU, R.T.; AZEVEDO, E.H. de F.; MUNIZ, C.R. Pesquisa de salmonella sp. Listeria sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.3, p.162-165, 2003.
- FLEMING, D. W.; STEPHEN, L. C.; MACDONALD, K. L.; BRONDUM, J.; HAYES, P. S.; PLIKAYTIS, B. D.; HOL, M. B.; AUDURIER, A.; BROOME, C. V. E.; REINGOLD, A. L. Pasteurized Milk is a Vehicle of Infection in an Outbreak of Listeriosis. **New Engl. J. Med.**, v. 312, p. 404-407, 1985.
- FRANCO, B. D. G. M. E LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2004.
- FURLANETTO, S. M.; SANTOS, M. A. A.; HARA, C. *Listeria* spp. avaliação da eficiência de quatro meios de plaqueamento no seu isolamento. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, n. 46, p. 30-34, 1996.
- GANDRA, E.A.; GANDRA, T.K.V.; MELLO, W.S.; GODOI, H.S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Sci. Technol**, Maringá. v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.
- GITTER, M.; BRADLEY, R.; BLAMPIED, P.H. *Listeria monocytogenes* infection in bovine mastitis. **Vet. Rec.** v.107, p. 390– 393, 1980.

- GOMBAS, D.E.; CHEN, Y.; CLAVERO, R.S.; E SCOTT, V.N. Survey of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods **J. FOOD PROT.**, v. 66, n.4 P. 559-569, 2003.
- GOULET, V.; DE VALK, H.; PIERRE, O.; STAINER, F.; ROCOURT, J.; VAILLANT, V.; JACQUET, C. E DESENCLOS, J.C. Effect of Prevention Measures on Incidence of Human Listeriosis, France 1987-1997. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, p. 983-988, 2001.
- GUERRA, M. M. e BERNARDO, F. M. A. Caracterização de efeitos inibidores de *Listeria monocytogenes* Scott A produzidos pela microflora de maturação de queijo de Alenteja. **Rev. Port. Cienc. Veter.**, v.96 n.538, p. 65-69, 2001.
- HAMDI, T. M.; NAIM, M.; MARTIN, P.; JACQUET, C. Identification and Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated in raw milk in the Region of Algiers. **International Journal of Food Microbiology**. v.116, n.1, p. 190-193, 2007.
- HOF, H.; NICCHTERLEIN, T.; KRETSCHMAR, M. Management of Listeriosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, p. 345-357, April, 1991.
- HOFER, C. B.; MELLES, C. E. A.; HOFER, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipient. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.41, p. 375-377, 1999.
- HOFER, E.; NASCIMENTO, R. S.; OLIVEIRA, M.A. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de caso em pacientes no Distrito Federal. **Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.**, v. 31, n. 2, p. 32-36, 1998.
- HOFER, E.; REIS, C. M. F. Espécies e sorovares de *Listeria* isolados de animais doentes e portadores no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 2, n. 25, p. 79-83, 2005.
- HOFER, E.; RIBEIRO, R.; FEITOSA, D. P.; Species and Serovars of the genus *Listeria* isolated from Different Sources in Brazil from 1971 to 1997. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 615-620, 2000.

- HOFFMAN, F. L.; SILVA, J. V.; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica e queijos tipo "Minas frescal", vendidos em feiras livres na região de São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 96, p. 69-76, 2002.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11290. **Microbiology of food and animal feeding stuffs** – Horizontal method for the detection of *Listeria monocytogenes* spp., 1th ed., 2004.
- IRETON, K. E COSSART, P. Host–pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. **Annu. Rev. Genet.**, v. 31, p. 113–138, 1997.
- JAY, J. M. Listerioses de origem animal. In: JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: **Artmed**, cap. 25, p. 517-542, 2005.
- JAY, J. M. Foodborne Listeriosis. **Modern Food Microbiology**, cap. 25, 6<sup>a</sup>. ed, 2000.
- JENSEN, A.; FREDERIKSEN, W.; AND GERNER S. P. Risk factors for listeriosis in Denmark, 1989–90. **Scand J Infect Dis** v. 26, p. 171–178, 1994.
- JENSEN, N. E.; AARESTRUP, F. M.; JENSEN, J. AND WEGENER, H.C. *Listeria monocytogenes* in bovine mastitis. Possible implication for human health. **Int. J. Food Microbiol.**, v.32, p. 209–216, 1996.
- JOHANSSON, T.; RANTALA, L.; PALMU, L.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish products and in a production plant. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 111- 119, 1999.
- KABUKI, D. Y.; KUA, A. Y.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J.; Molecular subtyping and brocking of *Listeria monocytogenes* in Latin-style fresh cheese processing plants. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 87 n.9, p. 2803-2812, 2004.
- KABUKI, D.Y. Contagem de *Listeria* spp. pelo método do número mais provável (NMP), avaliação da sua ocorrência em carnes de frango e da eficiência de sanitizantes na redução da contaminação por *L. monocytogenes*. 91 f.

**(Dissertação de Mestrado)** – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

KASNOWSKI, M. C. *Listeria* spp., *Escherichia coli*: isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída. 2004. 110 f. **Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal)** - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

KLIMA, R.A. AND MONTVILLE, T.J. The regulatory and industrial responses to listeriosis in the USA: a paradigm for dealing with emerging foodborne pathogens. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 87-93. 1995.

KOMATSU, R. S.; RODRIGUES, M. A. M.; LORENO, W. B. N.; SANTOS, K. A. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos minas frescal produzidos em Uberlândia-MG, **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 316-321, Mar./Apr. 2010.

KONEMAN, E. W. **Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, p. 1465, 2001.

LINNAN, M. J.; MASCOLA, L.; LOU, X. D.; GOULET, V.; MAY, S.; SALMINEN, C.; WHIRD, D.; YONEKORA, M. L.; HAYES, P.; WEAVER, R.; AUDURIER, A.; PLIKAYTIS, B. D.; FANNIN, S. L.; KLEKS, A.; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **N. Engl. J. Med.**, v. 319, n.23, p. 828, 1988.

LONCAREVIC, S.; THAM, W. E DANIELSSON-THAM, M.L. The clones of *Listeria monocytogenes* detected in food depend on the method used. **Letters Appl. Microbiol.**, v. 22, p. 381-384, 1995.

LOW, J.C.; DONACHIE, W. A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. **The Veterinary Journal**, v. 153, p. 9-29, 1997.

MAIJALA, R.; LYYTIKÄINEN, O.; JOHANSSON, T.; AUTIO, T.; AALTO, T.; HAAVISTO, L. E HONKANEN-BUZALSKI, T. Exposure of *Listeria monocytogenes* Within an Epidemic Caused by Butter in Finland. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 70, p. 97-109, 2001.

- MALORNY, B.; HOORFAR, J.; HUGAS, M.; HEUVELINK, A.; FACH, P.; ELLERBYOEK, L.; BUNGE, C.; DORN, C.; HELMUTH, R. Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 241-249, 2003.
- MANFREDA, G.; DE CESARE, A.; STELLA, S.; COZZI, M.; CANTONI, C. Occurrence and ribotypes of *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheeses. **Int. J. Food Microbiol**, v.102, p. 287–293, 2005.
- MANTILLA, S.P.S.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; SANTOS, E.B.; GOUVEIA, R. Ocorrência de *Listeria* spp em amostras de carne bovina moída comercializadas no município de Niterói. RJ, Brasil. **Comunicado Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1225-1230, 2007.
- MARICATO, E.; ARCURI, E.F.; LANGE, C. Prevalência sazonal de patógenos de origem alimentar de amostras de leite pasteurizado e queijo Minas frescal comercializadas em Juiz de Fora, Brasil. **Rev. Inst. Cândido Tostes**, v.61, p. 207-210, 2006.
- MARIN, V.A.; LEMOS, A.A.; FREITAS, E.I. Detecção de patógenos presentes nos alimentos: A falta de padronização e validação de métodos moleculares no Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 145, p. 46-50, 2006.
- MCLAUCHLIN, J. The Relationship Between *Listeria* and Listeriosis. **Food Control**. v. 7, p. 187-193, 1996.
- MCLAUCHLIN, J. E LOW, J. C. Primary Cutaneous Listeriosis in Adults: an Occupational Disease of Veterinarians and Farmers. **Vet. Rec.**, v. 24, p. 615-617, 1994.
- MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M. E TAUXE, R.V. Food Related illness and death in the United States. **Emerg. Infect. Disease**, v. 5, p. 607-625, 1999.
- MELO, J.F. Análise molecular do gene IAP de *Listeria monocytogenes* isolados de alimentos no Rio Grande do Sul. **Dissertação de Mestrado**. UFRGS, 2007.

- MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P.A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**. v. 21, n.2, p. 213-216, 2004.
- MOURA, S.M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. **Int. J. Food Microbiol.**, v.19, p. 229-237, 1993.
- OJENIYI, B.; WEGENER, H. C.; JENSEN, N. E. E BISGAARD, M. *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiological investigations in seven Danish abattoirs. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, p. 395 – 401, 1996.
- OLIVEIRA, A. B. A.; PAULA, C.M.D.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M.R.I.; TONDO, E.C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Rev. HCPA**, v. 30, p. 279-285, 2010.
- OLIVEIRA, A.N. *Bactérias do gênero Listeria em leite e derivados no comércio varejista de Goiânia-Goiás*. Belo Horizonte, 101p. **Dissertação Mestrado**. Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, 1993.
- PIMENTA, F.C.; FURLANETTO, S.M.P.; MAYER, L.W. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from foods. **Rev. Microbiol.**, v.30, p. 356-361, 1999.
- PINNER, R.W.; SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; HAYES, P.S.; DEEVER, K.A.; WEAVER, R.E.; PLIKAYTIS, B.D.; REEVES, M.; BROOME, C.V.; WENGER, J. D. AND THE *LISTERIA* STUDY GROUP. Role of Foods in sporadic Listeriosis. II. **Microbiological and Epidemiological Investigation**. JAMA. v. 267, p. 2046-2050, 1992.
- PINTADO, C.M.B.S.; OLIVEIRA, A.; PAMPHULA, M.E. AND FERREIRA, M.A.S.S. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. **Food Microbiol.**, v. 22, p. 79–85, 2005.
- PORTO, E.; EIROA, M. N. U. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Vegetables. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 21, n. 4, p. 282-286, 2001.

- QUINN, P.J. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. ARTMED Editora, Porto Alegre, 2005. HOF, H.; **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, n.2, p. 345-357, April 1997.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E. (Eds). *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: **Artmed**, p. 51, 2005.
- RAMOS, S.N.M. E COSTA, C.A. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijo artesanal tipo coalho comercializado na cidade de Manaus-AM, Brasil. **Acta Amazônica**, v.33, n. 4, p. 613-618, 2003.
- Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (**ANVISA**). Aprova o regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, 2001.
- ROBERTS, D. *Listeria monocytogenes* and Food: the U.K. Approach. **Dairy Food Environ. Sanit.** v.14, p. 202-204, 1994.
- ROCHA, J.S.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.2, p. 263-272, 2006.
- ROCOURT, J. *Listeria monocytogenes*: the state of the science. **Dairy Food Environ. Sanit.** v.14, p. 70–82, 1994.
- ROCOURT, J.; ESPAZE, E.P.; MINCK, R.; CATIMEL, B.; HUBERT, B.; AND COURTIEU, L.A. 1989. Cluster of listeriosis isolates with different serovar and phagovar characteristics. **Lancet**, v. 334, p.1217–1218, 1989.
- ROCOURT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**. Fundamentals and Frontiers. 1997.
- ROCOURT, J. Risk factors for Listeriosis. **Food Control**. v.7, p.195-202, 1996.
- ROSSEN, L.; HOLMSTROM, K.; OLSEN, J.E.; AND RASMUSSEM, O. F. A rapid polymerase chain reaction (PCR) – based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. **Int. Journal of Food Microb.**, v. 14, n. 2, p. 145-151, 1991.

- ROSSEN, L.; HOLMSTRØM, K.; OLSEN, J.E.; RASMUSSEN, O.F. A rapid polymerase chain reaction (PCR) — based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. **Int. J. Food Microbiol.**, v.14 p.145–152, 1991.
- RYSER, E. T. Foodborne Listeriosis. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. 2nd Ed. Ryser, E. T. e Marth, E. H. (Eds). Marcel Dekker, Inc. New York. USA. p. 299-358, 1999.
- RYSER, E. T.; DONELLY, C. W. Listeria In: VANDERZANT, C. SPLITTSTOESSER, O. F. **Compendium of methods for the microbiology examination of foods**. Washington: Edward Brothers. p. 343-353, 2001.
- SAHIN, M.; BEYTUT, E. Abortions in sheep due to *Listeria ivanovii* en the kars region. **Turkish Journal Veterinary an animal Sciences**. v. 30, p. 503-506-2006.
- SAROJ, S. D.; SHASHIDHAR, R. E BANDEKAR, J. R. Genotypic characterization of Salmonella enterica serovar *Typhimurium* isolated from sprouts and fish. **Food Sci. Tech. Int.**, 2008.
- SCHLECH, W.F.; LAVIGNE, P.M.; BORTOLUSSI, R.A. Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. **N. Engl. J. Med.**, v.308, p. 203 - 206, 1983.
- SCHLECH, W.F. Listeriosis: Epidemiology, Virulence and the Significance of Contaminated Foodstuffs. **J. Hosp. Infect.** v.19, p.211-224,1991.
- SCHUCHAT, A.; DEEVER, K.; WENGER, J. D.; PLIKAYTIS, B. D.; MASCOLA, L.; PINNER, R. W.; REINGOLD, A. L.; BROOME, C. V. The *Listeria* Study Group; I. Role of Foods in Sporadic Listeriosis: Case-Control Study of Dietary Risk Factors. **JAMA**. v. 267, p. 201-204, 1991.
- SCHWAB, J.P. *Listeria monocytogenes* in queijo colonial artesanal comercializado in Porto Alegre. Porto Alegre, 101p. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1994.
- SCHWAB, J.P.; EDELWEISS, M.I.A.; GRAÇA, D.L. Identificação de *Listeria monocytogenes* pela técnica de imunohistoquímica em tecido nervoso central de

- ruminantes. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. n. 99,p. 65-66, 2004.
- SEELIGER, H.P.R. & JONES, D. *Listeria*. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** v. 2. ed. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharp, M.E., & Holt, J.G. p.1235-1245. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986.
- SEELIGER, H. P. R., E HOHNE, K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In T. Bergan, & J. R. Morris (Eds.), **Methods in Microbiology**, p. 31–49. New York, 1979.
- SENAI DN. Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial – Departamento Nacional. Núcleos de Informação **Tecnológica com foco em negócio: documento orientativo**. Brasília: SENAI, 2005.
- SILVA, C.A.M.; LEITÃO, M.F. de F. Influência da temperatura de armazenamento na proliferação microbiana e no tempo de vida útil de queijo tipo "Minas Frescal". In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 4, 1980, Rio de Janeiro. **Programa Oficial, Resumos**. Rio de Janeiro: **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p.186. 1980.
- SILVA, I.M.M.; ALMEIDA, R.C.C.; ALVES, M.A.O.; ALMEIDA, P.F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **Int. J. Food Microbiol.**, v.81, p. 241-248, 2003.
- SILVA, J. G. Características físicoquímicas e sensoriais do queijo minas artesanal da Canastra. 2007. **Dissertação de Mestrado**. (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras. 2007.
- SILVA, M.C.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Food Protect.**, v. 61, n. 3, p. 354-356, 1998.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. 2.ed. São Paulo: **Varela**. 1997.

- SILVA, W.P; LIMA, A. S.; GANDRA. E. A.; ARAÚJO, M. R.; MACEDO, P.; DURVAL, E. H. *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciênc. Rural**, v. 34, n.3, p. 911-916, 2004.
- SOUZA, R.A. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo tipo coalho artesanal comercializado à temperatura ambiente em Fortaleza - CE. Fortaleza. 78p. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Ceará, 2002.
- SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; ANTONI, G.L. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 2nd ed. Washington: ASM, p. 383-409, 2001.
- TAPPERO, J.; SCHUCHAT, A.; DEEVER, K. A.; MASCOLA, L.; WENGER, J. D. AND THE *LISTERIA* STUDY GROUP. Reduction in the Incidence of Human Listeriosis in the United States: Effectiveness or Prevention Efforts? **JAMA**. n. 273, p.1118-1123, 1995.
- TRAVANGIN, B.N.F.S. Estudo da formação de Biofilmes de *Listeria monocytogenes* frente a diferentes condições encontradas em laticínios. Dissertação de Mestrado. USP, 2010.
- UNNEVEHR, I.; ROBERT, T. Food safety incentives in a changing World food system. **Journal of food control**, v. 13, p. 73-76. 2002.
- USDA-FSIS. Pathogen Reduction: Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems; **Final Rule**. Fed. Regist. v. 61, p. 38805–38989, 1996.
- VAISSAIRE, J. Epidemiology of Animal Listeria Infections in France. Bull. **Acad. Natl. Med.**, v.184, p. 275-286, 2000.
- VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; GONZÁLES-ZORN, B.; KREFT, J.; GOEBEL, W. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. **Microbes and Infection**, v.3, p. 571-584, 2001.
- VIEIRA, M. A. S. Controle de *Listeria monocytogenes* Scott A em queijo minas frescal através de tratamento termoquímico. 195p. **Tese de doutorado** - Universidade Estadual de Campinas, 2000.

WONG, H. C.; CHAO, W.L.; LEE, S.J. Incidence and Characterization of *Listeria monocytogenes* in Food Available in Taiwan. ***Applied and Environmental Microbiology***, v. 56, n. 10, p.3101-3104, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – **WHO Bulletin**, v. 46, p. 378-1786, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- Working Group, **WHO Bulletin**, v.66, p. 421-428, 1988.

ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 862-867, 2007.

## CAPITULO II

### PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE PCR E NESTED PCR PARA A DETECÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM QUEIJOS MINAS FRESCAL

#### 1. Introdução

Nas últimas décadas, diversos surtos de doenças de origem alimentar, leite pasteurizado, queijos macios tipo Mexican *style* e queijo mole tipo "Vacherin Mont d'Or", têm sido relatados (FARBER & PETERKIN, 1991). O queijo Minas frescal é um dos queijos mais populares do Brasil e é consumido por todas as camadas da população. É um produto de massa crua, com alto teor de umidade (46 a 55%), não maturado e que deve ser consumido nos primeiros quinze dias após sua fabricação, por ser altamente perecível mesmo sob refrigeração (SILVA et al., 2003; PERRY, 2004; HOFFMAN et al., 2003). Os queijos de massa mole, de alto pH e umidade elevada permitem o desenvolvimento de diversos microrganismos (VARNAN & SUTHERLAND, 1994).

Devido à sua composição, o queijo Minas Frescal representa um excelente substrato para o desenvolvimento de microrganismos, inclusive de *Listeria monocytogenes*, um patógeno considerado emergente e que apresenta capacidade de multiplicação sob temperaturas de refrigeração e de sobreviver, durante longos períodos, mesmo em condições adversas (NALDINI, 2002).

O gênero *Listeria* está composto pelas espécies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. murrayi* sendo que,

apenas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são consideradas como potencialmente patogênicas para humanos e animais (COCOLIN et al., 2002; KASNOWSKI, 2004).

*L. monocytogenes* é um patógeno intracelular facultativo, que pode se multiplicar em macrófagos, células epiteliais e fibroblastos cultivados. As listérias desenvolve-se em temperatura de 1 a 45°C, sendo a faixa ótima de 30 a 37°C, embora existam relatos sobre o crescimento a 0°C. Suportam repetidos congelamentos e descongelamentos (FRANCO & LANDGRAF, 2004).

A listeriose é considerada como uma das mais importantes doenças de origem alimentar e também é uma zoonose, sendo que os animais são importantes reservatórios na manutenção do agente no ambiente (ACHA & SZYFRES, 1987). A relevância de *L. monocytogenes* em saúde pública diz respeito, de um lado, à gravidade da manifestação clínica, resultante do comprometimento do sistema nervoso central, e de outro, à possibilidade da infecção acometer preferencialmente as gestantes, com sérias conseqüências para os fetos (GERMANO & GERMANO, 2003).

Devido à gravidade das infecções, nas quais a taxa de mortalidade em indivíduos pertencentes aos grupos de risco pode alcançar até 50%, e por não ser ainda conhecida a dose mínima infectante, nos Estados Unidos a Food and Drug Administration (FDA) estabeleceu a norma de “tolerância zero” para a presença de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo, sendo seguida pelo United States Department of Agriculture (USDA) (Di MAIO, 2000; LACIAR et al., 2006; CABANES et al., 2002). Alguns países da Europa têm sido mais tolerantes, admitindo a presença de até 100 células de *L. monocytogenes* por grama ou por mililitro de alimento (CALEIRO, 2009).

No Brasil, está previsto apenas limite de tolerância para a presença de *L. monocytogenes* em queijos de muita alta, de alta e de média umidade, como por exemplo, o queijo tipo Minas frescal, o tipo Minas Padrão e o tipo Mussarela, respectivamente, sendo o critério microbiológico estabelecido por: n=5; c=0; m=0, por meio de legislações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997; BRASIL, 2004) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001).

Mesmo com inúmeros trabalhos realizados sobre *L. monocytogenes*, há poucos estudos referentes à sensibilidade e especificidade das tecnologias utilizadas para detecção deste microrganismo em queijos de muito alta umidade, que forneçam dados para melhorar a eficácia de medidas de controle de qualidade.

As metodologias convencionais para detecção do *L. monocytogenes* em alimentos são demoradas e utilizam características fenotípicas para confirmação da presença do microrganismo. O surgimento de tecnologias moleculares vem proporcionando resultados eficientes e mais rápidos na detecção de *L. monocytogenes* em alimentos. Dentre os diagnósticos moleculares, destaca-se a PCR que proporciona resultados mais rápidos e eficazes na detecção de microrganismos em alimentos. A sensibilidade e especificidade deste teste diagnóstico, mostrou-se mais eficiente em comparação a metodologia microbiológica tradicional. A utilização da Nested PCR é ainda melhor que a PCR convencional, pois utiliza-se outro par de primers aumentando assim sua especificidade e sensibilidade.

Assim, neste estudo objetivou-se padronizar uma técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) e Nested PCR para detecção de *L. monocytogenes* em queijos de muito alta umidade tipo Minas Frescal, visando a verificação da sensibilidade e da especificidade desta técnica, em comparação com metodologia convencional para detecção desse microrganismo, contribuindo para a melhoria dos sistemas de fiscalização de derivados lácteos.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Cepa de *L. monocytogenes* e preparo de inóculos**

Uma cepa de *L. monocytogenes* ATCC 7644, mantida congelada a -80°C em caldo tripticase de soja (TSB, Oxoid, Basingstoke, England) acrescido de glicerol (20%), foi estriada em ágar tripticase de soja (TSA, Oxoid) acrescido de sangue eqüino desfibrinado (7%), com incubação a 37°C por 24h. Após verificação de pureza da cultura, uma colônia isolada foi semeada em TSB (Oxoid) e incubada a 37 °C *overnight*.

A cultura obtida foi diluída em TSB (Oxoid) até atingir uma turvidez semelhante à escala 1 de McFarland, que corresponde a aproximadamente  $3 \times 10^8$  UFC/mL. A partir dessa cultura foi realizada diluição seriada em escala decimal utilizando-se solução NaCl 0,85% para obtenção de inóculos com concentrações aproximadas de 1, 10, 100 e 1.000UFC/mL.

Para confirmação da concentração exata das culturas obtidas, foram realizadas diluições seriadas em escala decimal utilizando NaCl 0,85% e semeadas em duplicata e por superfície em agar cromogênico ALOA (Oxoid) e Osford (Oxoid). Após incubação a 37°C por 24h as colônias formadas foram enumeradas e os resultados obtidos expressos em UFC/mL.

## **2.2. Produção de queijo Minas frescal e contaminação artificial**

A massa de queijo tipo Minas frescal foi produzida em laticínio experimental. Foram utilizados aproximadamente 100L de leite desnatado, submetidos a processo de microfiltração sob temperatura de 50°C. Após a microfiltração o leite foi transferido para um tanque de aço inoxidável, no qual permaneceu até atingir 36°C. Em seguida foram adicionados: 40mL de cloreto de cálcio, 300g de cloreto de sódio, 70mL de coalho líquido e 25mL de ácido láctico. A massa permaneceu em repouso até atingir o ponto de corte, quando foi cortada para obtenção de cubos grandes, sendo em seguida separada do soro por processo de mexedura. Da massa obtida foram extraídas cinco alíquotas de 1500g cada, que foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados.

As alíquotas de massa de queijo tipo Minas frescal foram artificialmente contaminadas com a cultura de *L. monocytogenes* em condições assépticas, obtendo-se os seguintes tratamentos: T1, que correspondeu ao controle negativo (sem adição de inóculo); T2, com 1UFC/g; T3, com 10UFC/g; T4 com 100 UFC/g; e T5 com concentração final de 1000UFC/g. Em seguida, as massas foram homogeneizadas e, acondicionadas em formas esterilizadas para obtenção de queijos com aproximadamente 150 g. Após dessoragem a 4 °C, os queijos obtidos foram embalados em sacos plásticos esterilizados e conservados a 4 °C.

## **2.3. Análises microbiológicas**

### **2.3.1. Coleta de amostras**

No dia da produção (dia 0), e após 5 e 10 dias de estocagem sob refrigeração (4°C), uma amostra de queijo de cada tratamento foi coletada e analisada quanto a presença de *L. monocytogenes* por métodos convencionais e moleculares. As análises microbiológicas convencional, PCR convencional e Nested foram realizadas em 3 repetições.

### **2.3.2. Detecção convencional de *L. monocytogenes***

A detecção de *L. monocytogenes* foi realizada conforme protocolo ISO 11290—1/A1-2004 e ISO 11290—1/A2-2004. Alíquotas de 25g de amostra de cada tratamento foram coletadas assepticamente e, transferidas para bags estéreis contendo 225mL de caldo Half-Fraser (Oxoid) sem suplemento, homogeneizados e incubados a 20 °C por 1h.

Em seguida, ao restante do caldo Half-Fraser foi adicionado suplemento específico (Oxoid) e reincubado a 30°C por 24h. Ao final do período de incubação, 0,1mL do caldo Half-Fraser foi transferido para 10mL de caldo Fraser (Oxoid), com incubação a 35 °C por 24h; após a incubação foi semeado, por esgotamento, em ALOA (agar *Listeria* according Ottaviani and Agosti) e Agar Oxford (Oxoid), com incubação a 35 °C por 24-48h. A presença de colônias típicas de *Listeria* spp. (ALOA: pequenas colônias azuis esverdeadas, com halo de precipitação ao redor; Oxford: pequenas colônias acinzentadas, com halos escuros ao redor) foi considerado como resultado positivo para *L. monocytogenes*.

### **2.3.3. Detecção molecular de *L. monocytogenes*: PCR e Nested PCR**

Alíquotas de 25g das amostras foram retiradas assepticamente para detecção molecular de *L. monocytogenes*, e transferidas para bags esterilizadas contendo 225mL de solução salina peptonada a 0,1% (Oxoid). Após homogeneização, volumes de 1, 5 e 10mL foram centrifugados a 10.000RPM por 15min. O sobrenadante das alíquotas de 5 e 10mL foi descartado e ressuspendido com 1mL de solução salina peptonada a 0,1% (Oxoid), e novamente centrifugados a

10.000RPM por 15min. Após a centrifugação, todos os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* foram ressuspensos com 1mL de solução salina peptonada a 0,1% (Oxoid). O material obtido foi submetido à extração de DNA utilizando o kit WIZARD® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, EUA).

A detecção de *L. monocytogenes* pela técnica de PCR foi realizada conforme protocolo descrito por Border et al. (1990), utilizando os primers LM1 (**CCTAAGACGCCAATCGAA**) e LM2 (**AAGCGCTTGCAACTGCTC**), que detecta um fragmento do gene *hlyA* responsável pela codificação de listeriolisina (LLO), e resulta num produto de PCR com aproximadamente 702pb. Cada reação foi composta por um total de 25,0µL, constituída por 12,5µL do kit para PCR Go Taq Green Master Mix 2x (Promega), 1,0µL de cada primer na concentração de 10 pMol/µL, 2,0µL do DNA extraído e água ultra pura até completar o volume final.

As condições de amplificação foram 5min a 94°C, 35 ciclos de 30s a 94°C, 45 s a 50°C (anelamento), 45s a 72°C e extensão final de 5min a 72°C. Marcador de peso molecular de 100pb e os produtos de PCR obtidos foram adicionados de GelRed 20 x (Biotium Inc., Hayward, EUA), separados em gel de agarose a 1% e visualizados em transiluminador.

A Nested PCR foi realizada utilizando 1,0µL do produto de PCR obtido previamente, com os primers LisF (**GATGCAGTGACAAATGTGCC**) e LisR (**GATTCACTGTAAGCCATTTCG**), desenhados considerando a sequência do gene *hlyA* disponível do GenBank Número de Acesso: NC-002973.6. Cada reação foi composta por um total de 25µL, constituída por 12,5µL do kit para PCR Go Taq Green Master Mix 2x (Promega), 1,0µL de cada primer na concentração de 10 pMol/µL, 1,0µL do produto de PCR previamente obtido e água ultra pura até completar o volume final.

As condições de amplificação foram um ciclo de 1min a 94°C, 30 ciclos de 30s a 94°C, anelamento a 60°C por 30s, 72°C por 30s e extensão final de 5min a 77°C, com manutenção a 4°C até retirada do termociclador. Marcador de peso molecular de 100pb e os produtos de PCR obtidos foram adicionados de GelRed 20 x

(Biotium Inc., Hayward, EUA), separados em gel de agarose a 1% e visualizados em transiluminador.

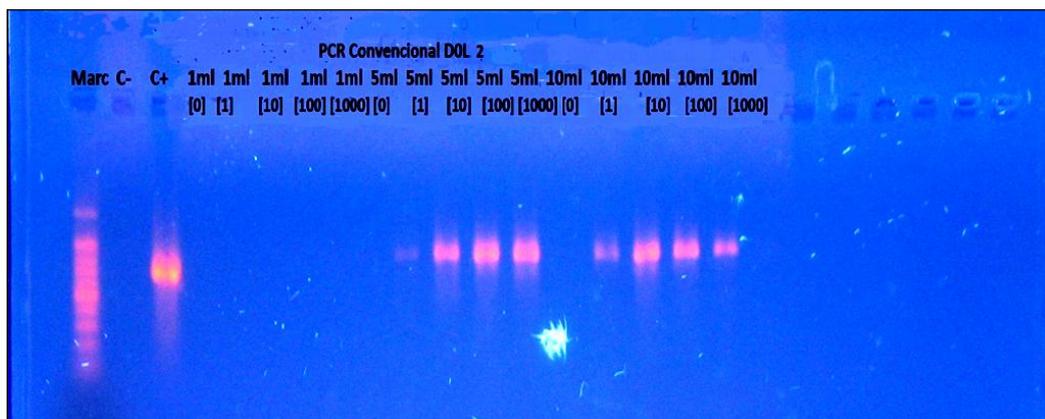
### 3. RESULTADOS

**Tabela 1.** Frequências de resultados positivos obtidos na detecção de *L. monocytogenes*, em massas de queijos tipo minas frescal contaminadas artificialmente, por meio de metodologia microbiológica ISO11290 e técnicas moleculares de PCR convencional e Nested PCR.

Tratament o UFC/g	Dia 0							Dia 5							Dia 10						
	ISO 1129 0	PCR Convencional			PCR Nested			ISO 1129 0	PCR Convencional			PCR Nested			ISO 1129 0	PCR Convencional			PCR Nested		
		1m L	5m L	10m L	1m L	5m L	10m L		1m L	5m L	10m L	1m L	5m L	10m L		1m L	5m L	10m L	1m L	5m L	10m L
<b>T1 (0)</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>T2 (1)</b>	100	0	0	33,3	100	100	100	100	0	0	0	100	100	66,6	100	0	0	0	100	100	100
<b>T3 (10)</b>	100	0	33,3	33,3	100	100	66,6	100	0	0	0	100	100	100	100	0	0	0	100	100	100
<b>T4 (100)</b>	100	0	33,3	33,3	100	100	66,6	100	0	0	0	100	66,6	100	100	0	0	0	100	100	100
<b>T5 (1000)</b>	100	0	33,3	33,3	66,6	100	100	100	0	0	33,3	100	100	66,6	100	0	0	0	100	100	100

Os resultados obtidos nessa pesquisa demonstraram que as três metodologias avaliadas foram capazes de detectar *L. monocytogenes* em massas de queijo tipo Minas frescal, contaminados artificialmente. Na análise dos resultados obtidos nos diferentes períodos, foi possível observar que, no dia zero (primeiro dia de contaminação), a metodologia ISO foi capaz de detectar a presença de *L. monocytogenes* em todos os tratamentos, com exceção do T1 que representou o controle. A frequência de detecção pela metodologia ISO foi de 100% em todos os volumes utilizados. Os resultados obtidos nas análises realizadas nas amostras no dia 5 e dia 10, mantidas sob temperaturas de refrigeração, demonstraram que a metodologia ISO manteve a frequência de detecção de *L. monocytogenes* em 100% das amostras (Tabela 1).

Na avaliação da PCR convencional no dia 0, a maior frequência de detecção foi de 33,3% nos tratamentos T3, T4 e T5 quando utilizados volumes de 5mL e, a partir do tratamento T2 quando utilizado o volume de 10mL (Figura 1). Com 5 dias de fabricação a PCR convencional demonstrou uma brusca diminuição na frequência de detecção que somente ocorreu nas amostras contaminadas com 1000 UFC/g e quando utilizados 10mL de volume para o processamento da reação (Figura 2), que pode ser explicado pelo período de incubação e pelo fato de a bactéria apresentar característica psicotrófica. Já com 10 dias de fabricação a PCR convencional não pode detectar o patógeno em nenhum dos volumes e tratamentos utilizados.

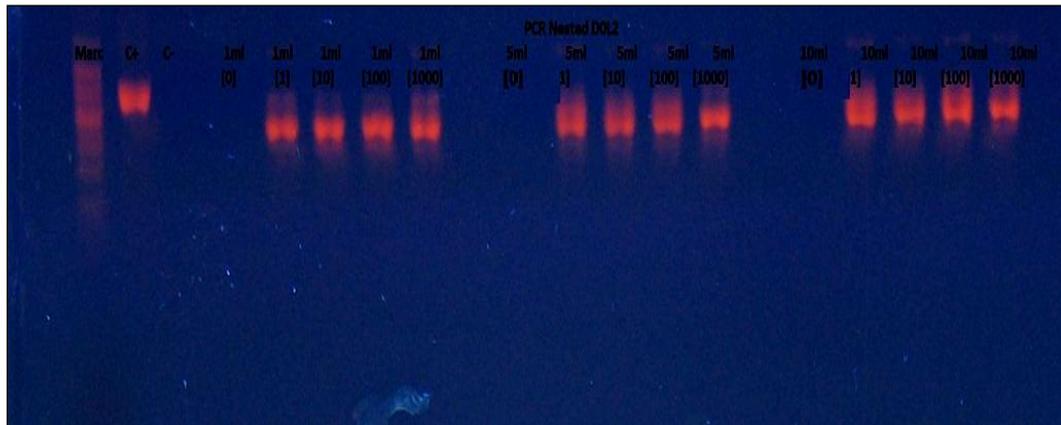


**Figura 1.** PCR convencional realizado no dia 0; Canaleta - 1 Marcador; canaleta 2- controle negativo; canaleta 3 – controle positivo; canaleta 4 – 1 mL [0]; canaleta 5 – 1 mL [1]; canaleta 6 – 1 mL [10]; canaleta 7 – 1 mL [100]; canaleta 8 – 1 mL [1000]; canaleta 9 – 5 mL [0]; canaleta 10 – 5 mL [1]; canaleta 11 – 5 mL [10]; canaleta 12 [100]; canaleta 13 - 5 mL [1000]; canaleta 14 – 10 mL [0]; canaleta 15 – 10 mL [1]; canaleta 16 – 10 mL [10]; canaleta 17 – 10 mL [100]; canaleta 18 – 10 mL [1000]

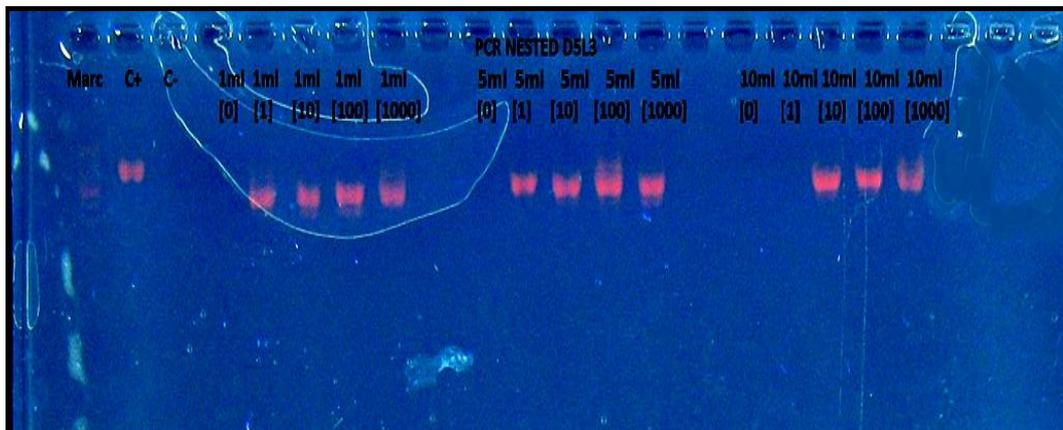


**Figura 2.** PCR Convencional realizado no Dia 5; canaleta 1 – Marcador; canaleta 2 – controle positivo; canaleta 3 – controle negativo; canaleta 4 – 1 mL [0]; canaleta 5 – 1 mL [1]; canaleta 6 – 1mL [10]; canaleta 7 – 1 mL [100]; canaleta 8 – 1 ml [1000]; canaleta 9 – 5 mL [0]; canaleta 10 – 5 mL [1]; canaleta 11 – 5 mL [10]; canaleta 12 – 5 mL [100]; canaleta 13 – 5 mL [1000]; canaleta 14 – 10mL [0]; canaleta 15 -10mL [1]; canaleta 16 – 10 mL [10]; canaleta 17 – 10mL [100]; canaleta 18 – 10mL [1000]

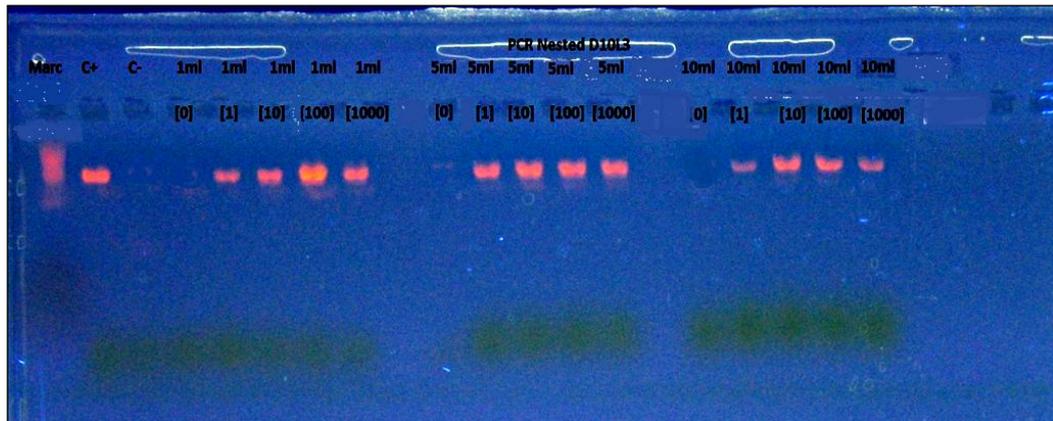
No dia 0 a Nested PCR demonstrou alta eficiência na detecção do patógeno em todos os tratamentos e com os três volumes testados, sendo que quando utilizado o volume de 5mL a frequência de detecção foi de 100% em todos os tratamentos, que podem ser devidos a uma influência da concentração de DNA (Figura 3). Com 5 dias de fabricação a Nested PCR (Figura 4) apresentou frequência de detecção de 100% em todos os tratamentos com volume de 1mL e, de no mínimo 66,6% nos outros volumes e tratamentos (Tabela 1), corroborando o resultado obtido no dia zero de que o aumento do volume não é relevante para esta metodologia. No dia 10, Nested PCR manteve a frequência de 100% na detecção de *L. monocytogenes* em todos os tratamentos e volumes de utilizados (Figura 5) e pode ter sido influência do período de manutenção da massa de queijo sob refrigeração, favorecendo o crescimento dessa bactéria que apresenta características psicrotóricas (Tabela 1).



**Figura 3.** Nested PCR realizado no Dia 0; canaleta 1 – Marcador; canaleta 2 – controle positivo; canaleta 3 – controle negativo; canaleta 4 – 1 mL [0]; canaleta 5 – 1 mL [1]; canaleta 6 – 1 mL [10]; canaleta 7 – 1 mL [100]; canaleta 8 – 1mL [1000]; canaleta 9 – 5 mL [0]; canaleta 10 – 5 mL [1]; canaleta 11 – 5 mL [10]; canaleta 12 – 5 mL [100]; canaleta 13 – 5 mL [1000]; canaleta 14 – 10 mL [0]; canaleta 15 – 10mL [1]; canaleta 16 – 10mL [10]; canaleta 17 – 10mL [100]; canaleta 18 – 10mL [1000]



**Figura 4.** Nested PCR realizado no Dia 5; canaleta 1 – marcador; canaleta 2 – controle positivo; canaleta 3 – controle negativo; canaleta 4 – 1mL [0]; canaleta 5 – 1mL [1]; canaleta 6 – 1 mL [10]; canaleta 7 – 1 mL [100]; canaleta 8 – 1 mL [1000]; canaleta 9 – 5 mL [0]; canaleta 10 – 5 mL [1]; canaleta 11 – 5 mL [10]; canaleta 12 – 5 mL [100]; canaleta 13 – 5 mL [1000]; canaleta 14 – 10mL [0]; canaleta 15 – 10mL [1]; canaleta 16 – 10mL [10]; canaleta 17 – 10 mL [100]; canaleta 18 – 10mL [1000]



**Figura 5.** Nested PCR realizado no Dia 10; canaleta 1 – marcador; canaleta 2 – controle positiva; canaleta 3 – controle negativo; canaleta 4 – 1mL [0]; canaleta 5 - 1mL [1]; canaleta 6 – 1mL [10]; canaleta 7 – 1 mL [100]; canaleta 8 – 1 mL [1000]; canaleta 9 – 5 mL [0]; canaleta 10 – 5 mL [1]; canaleta 11 – 5 mL [10]; canaleta 12 – 5 mL [100]; canaleta 13 – 5 mL [1000]; canaleta 14 – 10mL [0]; canaleta 15 – 10mL [1]; canaleta 16 – 10mL [10]; canaleta 17 – 10mL [100]; canaleta 18 – 10mL [1000]

#### 4 - Discussão

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstram que a metodologia ISO foi capaz de detectar o microrganismo em todos os tratamentos utilizados o que também pode ser observado utilizando a Nested PCR, já a metodologia de PCR convencional demonstrou baixa eficiência na detecção do patógeno. O desempenho da PCR convencional nas condições testadas está condicionado a contagens maiores do que 10UFC/g de *L. monocytogenes* em queijos de muita alta umidade para que seja possível amplificação na reação (Figura 1). Isto demonstra a necessidade de alta concentração de *Listeria monocytogenes* para detecção do microrganismo por PCR convencional direto dos queijos.

Já o desempenho da Nested PCR não foi alterado em função do aumento de volume, sendo possível à obtenção do aumento na concentração de DNA por meio da amplificação realizada na PCR convencional. Esta primeira amplificação não foi o suficiente para detectar o patógeno na PCR convencional, mas permitiu a detecção de *Listeria monocytogenes* utilizando Nested PCR. Esta metodologia obteve resultados positivos até para concentrações de aproximadamente 1 UFC/g do produto original, e isso testando até mesmo 1 mL da diluição de 1:10 do queijo (ou seja, 0,1 mL de *Listeria*/mL) demonstrando alta sensibilidade.

A dificuldade em se detectar o microrganismo através da reação da PCR convencional pode ser devido à baixa quantidade do microrganismo ou pureza do DNA (AMAGLIANI et al., 2007; POIARES et al., 2008).

Na presente pesquisa, a sensibilidade da reação foi avaliada de maneira semelhante à realizada por Rantsiou et al. (2008), na qual série de diluições decimais de *L. monocytogenes* ATCC 7644 foram realizadas e a partir das análises de PCR verificou-se a possibilidade de detecção do patógeno, sendo que a PCR convencional também não se mostrou eficaz na detecção do microrganismo em queijo minas frescal e as análises de sensibilidade analítica mostraram que, o ensaio de qPCR foi altamente sensível para a detecção a partir de um baixo número de cópias dos ácidos nucleicos alvo.

Estes resultados reforçam a observação de que o aumento do volume utilizado na PCR convencional, com conseqüente aumento da concentração do DNA, pode interferir na detecção do microrganismo, e que a Nested PCR apresenta vantagens na sua utilização por diminuir consideravelmente, o tempo necessário para o diagnóstico, já que com a utilização de volume de 1mL, dispensa a realização de centrifugações para a obtenção do *pellet* de DNA.

Em pesquisa realizada por Peres (2007), atribuí a diminuição da sensibilidade da reação de PCR multiplex quando *Listeria monocytogenes* é incubada em queijo, à lise insuficiente da bactéria após crescer no leite devido a reagentes utilizados na extração e componentes do alimento como gordura, proteínas que dificultam a lise celular e conseqüente diminuição da quantidade de DNA. Tais fatores podem ter contribuído a não detecção do patógeno quando analisado por PCR convencional. Ainda, contaminantes presentes na amostra podem inibir a reação e, enzimas termoestáveis produzidas por microrganismos podem degradar os produtos da amplificação (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

De acordo com Rodrigues et al. (2009), os resultados negativos podem ser devidos à falha de amplificação ou até mesmo, por erro na extração do DNA e Franco & Landgraf (2004), consideram que os resultados negativos dos testes dependem do número e tamanho das amostras examinadas, da sensibilidade da metodologia empregada e do número de patógenos presentes. Nessa pesquisa,

excluídos possíveis erros de extração e considerando-se os volumes e tamanhos de inóculos empregados, podemos afirmar que a PCR convencional apresentou baixo desempenho na detecção do microrganismo.

Ainda, outros autores descrevem diversos fatores que podem interferir na técnica de PCR diminuindo a sensibilidade e, gerando resultados falsos negativos nos ensaios, entre os quais são citados: os meios de cultura e reagentes utilizados na extração de DNA, a baixa sensibilidade da reação, a presença de inibidores da *Taq* polimerase na amostra, o baixo conteúdo de DNA na amostra (como em sangue e alimentos), o método de extração, a concentração de íons de magnésio, a temperatura e a duração de cada ciclo, a quantidade de ciclos, a concentração dos dNTPs e da polimerase, assim como a concentração de DNA utilizado na reação, (GANDRA et al., 2006, 2008; PENHA et al., 2008; ABRAHÃO, 2005).

Peres et al. (2010), relatam que em 47 amostras leite com inóculos de *L. monocytogenes* variando de zero a 1.900 UFC/mL, não observou-se detecção por meio da técnica de PCR quando esta foi realizada nos cultivos em LEB após 24 horas de incubação, por métodos diferenciados usados para extração de DNA; após 48 horas de enriquecimento em LEB, resultados positivos foram encontrados em amostras de leite inoculadas com 1UFC/mL. Entretanto, melhores resultados foram obtidos quando a PCR foi realizada utilizando-se DNA obtido diretamente da colônia suspeita em meio sólido.

Resultados semelhantes a esta pesquisa foram obtidos por Rijpens & Herman (2004), que utilizaram PCR convencional para detectar *L. monocytogenes* em queijos artificialmente contaminados e relataram que a PCR convencional não foi o melhor método de detecção, quando comparado à metodologia microbiológica convencional e que, especialmente em queijos moles, os métodos que incorporam meios de enriquecimento seletivos apresentaram melhores resultados que a PCR convencional.

Na presente pesquisa, as amostras submetidas à análise microbiológica convencional, puderam ser detectadas em todos os tratamentos sendo que, todas foram submetidas a etapa de enriquecimento. Já quando analisadas por PCR convencional, não submetidas a enriquecimento, estas não puderam ser detectadas.

Em contrapartida tais amostras negativas a PCR convencional quando submetidas a uma segunda amplificação por Nested PCR, geraram resultados positivos para as mesmas.

Gandra et al. (2008), relatam que uma das principais limitações da PCR está relacionada à presença de substâncias inibidoras nas amostras oriundas da extração de DNA, causando falha na amplificação e conseqüentemente, resultados falso negativos e Guilbaud et al. (2005) afirmam que os métodos rápidos utilizados, atualmente, para identificar *L. monocytogenes*, necessitam de uma concentração mínima do microrganismo de  $10^5$ UFC/ml.

Resultados semelhantes aos obtidos na presente pesquisa foram encontrados por Aslam et al. (2003), que desenvolveram uma técnica de PCR convencional para detecção de *L. monocytogenes* em leite que, sob condições normais, apresentou nível de detecção baixo e após incubação, foi possível detectar apenas,  $10^2$  UFC/mL de bactéria.

Nesta pesquisa, apesar de constatarmos que a metodologia tradicional preconizada pela ISO apresentou alta eficiência na detecção de *L. monocytogenes*, ela também apresenta as desvantagens de ser laboriosa e demorada por depender de etapas de pré-enriquecimento, de enriquecimento e de testes bioquímicos confirmatórios. Em contrapartida, a pesquisa demonstrou que o emprego da Nested PCR contribui para o aumento da sensibilidade e especificidade da reação através da utilização de dois pares de primers específicos ao microrganismo, que diminui a probabilidade de resultados falsos negativos.

O emprego de Nested PCR, para aumento da sensibilidade também foi relatado por Estrada et al. (2007), no diagnóstico molecular da *Yersinia enterocolitica* em carnes, que consiste na reamplificação, com *primers* internos, de um fragmento amplificado em uma primeira reação. Os resultados da otimização da técnica quanto à concentração de reagentes, especificidade, sensibilidade e a detecção de microrganismos foram obtidos após a seleção dessa associação de *primers* (TAKIUCHI et al., 2003; D'AGOSTINO et al., 2004).

No entanto, fatores que influenciam a realização da PCR convencional, bem como de outras variáveis da PCR nos alimentos continuam a ser investigados.

Apesar de demonstrar alta sensibilidade e especificidade, a PCR apresenta desvantagem pelo fato de incerteza do microrganismo estar viável podendo assim ser capaz de causar Listeriose. Isto mostra que a metodologia molecular pode ser utilizada como uma triagem ao diagnóstico de detecção de *Listeria* sendo posteriormente avaliada por metodologia ISO comprovando sua viabilidade. A ISO confirma o resultado positivo da Nested, mas a realização da técnica molecular no primeiro momento já apresenta o resultado positivo em menor tempo.

Ensaio semelhante foram descritos por outros autores (LEVIN, 2003; AZNAR & ALARCÓN, 2003; D'AGOSTINO et al., 2004). Freitas et al. (2006), relatam que um método baseado em PCR deve ter alto grau de acurácia e de diagnóstico, bem como um bom limite de detecção, garantindo-lhe assim alta especificidade e sensibilidade, o que foi obtido nessa pesquisa através da utilização de dois pares de primers.

Segundo Hoorfar et al. (2002a,b), as dificuldades para a reprodução de testes publicados, devido à variação no desempenho dos termocicladores, na eficiência das diferentes polimerase e na presença de inibidores da PCR na matriz da amostra, têm dificultado a implantação pelos laboratórios, particularmente aqueles com programas de garantia da qualidade. É necessário ter métodos baseados em PCR que sejam utilizados como padrões reconhecidos internacionalmente.

Padrões internacionais derivados de métodos tradicionais requerem um limiar de detecção de uma célula por 25 gramas de amostra. O limite de detecção teórico de uma célula microbiana por reação de PCR pode ser traduzido na prática em  $10^3$ - $10^4$  células por mL de amostra pré-enriquecida. Um pequeno volume inicial é usado na reação de PCR. Por esta razão, a análise por PCR é usualmente precedida por uma etapa de enriquecimento para se obter uma multiplicação de células bacterianas. A PCR deve detectar ao menos 10-100 cópias do DNA desejado. Esta detecção pode ser constatada na presente pesquisa através do desempenho obtido por meio da Nested PCR, que apresentou um limite de detecção mais baixo em relação a PCR convencional nos vários volumes utilizados.

As técnicas moleculares têm aumentado a velocidade e sensibilidade com que tais patógenos podem ser detectados e, permitido que

laboratórios identifiquem os organismos que não desenvolvem ou desenvolve-se lentamente em cultivos convencionais. No entanto, o ganho da análise em sensibilidade pode não ser necessariamente maior quando comparado com métodos convencionais. Por exemplo, em situações onde as amostras clínicas são coletadas e mantidas em boa qualidade, a quantidade de microrganismos presentes pode muito bem ser suficiente para a detecção pelos métodos convencionais (RALL et al., 2009).

Diversas pesquisas sugerem e, concordamos com esse postulado, que mais trabalhos sejam realizados empregando-se metodologias moleculares, como a utilização de técnicas que não somente detectem como também quantifiquem o DNA do microrganismo presente no alimento, pois através desta análise não só a detecção do patógeno como também a definição de quantidade de células presentes torna-se possível bem como a possibilidade de definição da vitalidade do microrganismo presente no alimento.

No entanto, a quantificação direta de *L. monocytogenes* em alimentos por PCR ainda é difícil porque, o microrganismo geralmente está presente em níveis muito baixos, conforme constatado por Gombas et al. (2003) e Norton (2002), que demonstraram que o enriquecimento da amostra é ainda, necessário para atingir o limite de detecção desejado em alguns testes diagnósticos.

Os métodos de rastreamento baseados em PCR oferecem resultados rápidos e confiáveis, e são ideais para testar amostras com uma alta probabilidade de resultados negativos referentes à presença de *L. monocytogenes* e, melhores métodos para a purificação facilitarão os ensaios quantitativos bem como, a detecção simultânea dos principais patógenos presentes em cada tipo de alimento por meio de multiplex PCR (KAWASAKI et al., 2005).

Assim, se considerarmos o curto prazo de validade desse tipo de alimento, que apresenta como principal característica a alta umidade que, por sua vez, favorece a multiplicação bacteriana, a Nested PCR pode ser considerada mais adequada e sua utilização como ferramenta de diagnóstico para os Serviços de Inspeção deve ser recomendada, considerando a obtenção de resultados com maior

rapidez e alta frequência na detecção de *L. monocytogenes*, indicando sensibilidade e especificidade suficientes para a sua aplicação.

## 5. Conclusão

Na presente pesquisa foi padronizada uma técnica de Nested PCR para detecção de *Listeria monocytogenes* em queijos de muito alta umidade. Além disso realizou-se a comparação de diferentes metodologias para detecção de *Listeria monocytogenes* em queijos de muito alta umidade, sendo possível concluir que:

- a metodologia microbiológica convencional ISO 11290 apresentou alta sensibilidade na detecção do patógeno em diferentes níveis de concentração;

- a técnica molecular de Nested PCR padronizada apresentou desempenho comparável à metodologia microbiológica convencional, com a vantagem de ser mais rápida, menos laboriosa e apresentar menos pontos críticos;

- Comparando-se as duas técnicas moleculares, a sensibilidade pode ser ainda mais evidenciada em relação a Nested PCR, já que obteve melhor desempenho na detecção do patógeno, em relação a todos os volumes e tratamentos utilizados nessa pesquisa.

Sendo assim, esta técnica pode contribuir positivamente com os órgãos de fiscalização, por proporcionar diagnósticos rápidos e eficazes, bem como melhorar o controle e prevenção da contaminação de derivados lácteos por *L. monocytogenes*. Por fim, mais estudos devem ser realizados no intuito de melhorar a sensibilidade e a especificidade de testes diagnósticos utilizados na detecção de microrganismos em alimentos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, P. R. S. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* e de outros microrganismos em gelados comestíveis fabricados e comercializados na região metropolitana de Curitiba. Dissertação de Mestrado. UFP, p.19, 2005.
- ACHA, P.N. E SZYFRES, B. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. **Pan American Health Organization**, 2ª edição, 1987.
- AMAGLIANI, G.; GIAMMARINI, C.; OMICCILOLO, E.; BRANDI, G.; MAGNANI, M. Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different DNA extraction methods. **Food Control**, v.18, p.1137-1142, 2007.
- ASLAM, M.; HOGAN, J.; SMITH, K.L. Development of a PCR-based assay to detect Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in milk. **Food Microbiol.**, v.20, p.345-350, 2003.
- AZNAR, R.; ALARCÓN, B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. **J. Appl. Microbiol.**, v.95, p. 958-966, 2003.
- BORDER, P.M.; HOWARD, J.J.; PLASTOW, G.S. et al. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.11, p.158-162, 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária Portaria nº 352 de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 04 de 01/03/2004. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade em Queijo Minas Frescal – Alteração na “Classificação”. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2004.

- CABANES, D.; DEHOUX, P.; DUSSURGET, O.; FRANGEUL, L.; COSSART, P. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. **Trends in Microbiology**, v. 10, n.5, p.238-245, 2002.
- CALEIRO, P.A.C.S.R. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária da carne de frango: pesquisa de *Listeria monocytogenes* por PCR. **Dissertação de Mestrado**. Universidade técnica de Lisboa, 2009.
- COCOLIN, L.; RANTSIOU, K.; IACUMIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 6273-6282, 2002.
- D'AGOSTINO, M.; WAGNER, M.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUTCHTA, T.; KARPISKOVA, R.; HOOFAR, J.; NOVELLA, A.; SCORTII, M.; ELLISON, J.; MURRAY, A.; FERNANDES, I.; KUHN, M.; PAZLAROVA, J.; HEUVELINK, A.; COOK, N. A validated PCR-based method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model – Towards and International Standard. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1646-1655, 2004.
- Di MAIO, H. *Listeria* infection in women. **Elsevier Science Inc.** – Honorable Mention, v.7, n.1, p. 40-46, 2000.
- FARBER, J.M. E PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, p. 476- 511,1991.
- FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos Alimentos**. Rio de Janeiro: **Atheneu**, 2ª edição, p. 32-40, 2004.
- FREITAS, E.; LEMOS, A.; MARIN, V. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 11, n. 4, p.1073-1083, 2006.
- GANDRA, E.A. Multiplex PCR para detecção de *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado. Pelotas, 2006. 69f. **Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)** - Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", UFPel, 2006.

- GANDRA, E.A.; GANDRA, T.K.V.; MELLO, W.S.; GODOI, H.S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, p. 109 -118, 2008.
- GERMAN, P.M.L. E GERMANO, M.I.S. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos, São Paulo, 2a edição. **Varela** (São Paulo), p. 79-90, 2003.
- GOMBAS, D. E.; CHEN, Y.; CLAVERO, R. S.; SCOTT, V.N. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **J. Food Prot.**, v. 66, n. 4, p. 559-569, 2003.
- GUIILBAUD, M.; COPPET, P.; BOURION, F.; RCHMAN, C.; PREVOST, H.; DOUSSET, X. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in biofilms by real-time PCR. **Appl Environ Microbiol.**, v. 71, p. 2190–2194, 2005.
- HOORFAR, J.; COOK, N.; MALORNY, B.; WAGNER, M.; DE MEDICI, D.; ABDULMAWJOOD, A. Letter to the editor. **Lett Appl Microbiol**, v. 38, n.2, p. 79-80, 2002.
- HOORFAR, J.; COOK, N. Critical aspects of standardization. In: Sachse, K., Frey, J., editors. PCR detection of microbial pathogens: Methods and protocols. Methods in molecular biology, New Jersey: Humana Press, v. 216, p. 51- 64, 2002.
- HOFFMAN, F. L.; SILVA, J. V.; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica de queijos tipo "Minas frescal", vendidos em feiras livres na região de São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 96, p. 69-76, mai. 2003.
- KASNOWSKI, M.C. *Listeria* spp. e *Escherichia coli*: Isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída. Niterói, RJ, 2004. 110 f. **Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal)**. Universidade Federal Fluminense, UFF. Niterói, RJ, 2004.
- KAWASAK, S.; HORIKOSHI, N.; OKADA, Y.; TAKESHITA, K.; SAMESHIMA, T.; KAWAMOTO, S. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples. **J. Food Prot.**, v. 68, p. 551-556, 2005.

- LACIAR, L.; VACA, R.; LOPRESTI, A. DNA Fingerprinting by ERIC – PCR for Comparing *Listeria* spp. Strains isolate from Different Source in San Luiz, Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 38, p. 55-60, 2006.
- LEVIN, R.E. Application of the polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in foods: a review of methodology. **Food Biotechnol**, v. 17, p. 99-116, 2003.
- NALDINI, M.C.M. Comportamento Diferencial de *Listeria monocytogenes* em Queijos Minas Frescal Elaborados pelo Método Convencional e por Acidificação Direta. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- NORTON, D.M. Reação em cadeia da polimerase baseada em métodos para detecção de *Listeria monocytogenes* para triagem em tempo real para o ambiente e amostras de alimentos. **J. AOAC Int.**, v. 85, p. 505-515, 2002.
- PENHA, G. A; SUZUKI, E. Y; UEDA, F. S; PERES, P. R. E. Diagnóstico da *Salmonella* para a avicultura: revisão de literatura. **Rev Cient. Elet. Méd Vet.** ISSN ano IV, n.10 p. 1670-7353,2008.
- PERES, N. D. Detecção de *Listeria monocytogenes* em leite: sensibilidade e especificidade da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). **Dissertação de Mestrado**. UFMG, 2007.
- PERES, N.D.; LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; ARCURI, E.F.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de reação de polimerase em cadeia em leite contaminado artificialmente. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.62, n.4, p. 973-979, 2010.
- PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.
- POIARES, L.; SANDRINI, F.; OSORIO, P. S.; LARGURA, A.; SIMÃO, R.C.G. Validação do método de detecção de *Clamydia trachomatis* por reação de polimerase em cadeia em tempo real. **RBAC**, v. 40, n. 3, p. 229-232, 2008.

- RALL, V. L. M.; MARTIN, J. G. P.; CANDEIAS, J. M. G.; CARDOSO, K. F. G.; SILVA, M. G. S.; RALL, R.; JUNIOR, J. P. A. Pesquisa de Salmonella e das condições sanitárias em frangos e lingüiças comercializados na cidade de Botucatu. **Bras. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 46, n.3, p.26-29, 2009.
- RANTSIOU, K.; ALESSANDRIA, V.; URSO, R.; PAOLA, D.; COCOLIN, L. Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p. 99–105, 2008.
- RIJPENS, N.; HERMAN, L. Comparison of selective and nonselective primary enrichments for the detection of *Listeria monocytogenes* in cheese. **J. Food Microbiol.**, v. 94, p. 15-22, 2004.
- RODRIGUES, A.D.; CANTARELLI, V. V.; FRANTZ, M. A.; PILGER, D. A.; PEREIRA, F. S. Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para detecção de HPV em amostras clínicas. **J. Brás. Patol. Méd Lab.**, v. 45, n. 6, p. 457-462, 2009.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: A laboratory manual** (3rd ed), Cold Spring Harbor Press, NY, USA, 2001.
- SILVA, I. M. M.; ALAMEIDA, R.C.C.; ALVES M. A.; ALMEIDA, P.F. Occurrence of *Listeria* ssp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 241-248, 2003.
- TAKIUCHI, E.; MEDICI, K. C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Otimização da reação em cadeia da polimerase (Semi-Nested – PCR) para a detecção da herpesvirus bovino tipo 1 em fragmentos de órgãos fetais e sêmen de bovinos naturalmente infectados. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 43-56, 2003.
- VAN DER ZANDEN, A. G.; KERMER, K.; SACHOULS, L. M.; CAIMI, K.; CATALDI, A.; HULLEMAN, A.; NAGELKERKE, N. L.; VAN SOOLINGEN, D. Melhoria da diferenciação e da facilidade de interpretação dos spoligotyping de *Micobacterium tuberculosis* isolados complexos através da introdução de

oligonucleotideos espaciador. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 12, p. 4628-4639, 2002.

VARNAN, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología. **Zaragoza: Acribia, SA**, p.476, 1994.

## CAPÍTULO III

### 1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo geral deste trabalho, de padronizar uma técnica molecular para detecção de *L. monocytogenes* em queijos de muito alta umidade foi plenamente alcançado. Apesar da técnica de PCR convencional não ter sido capaz de detectar o microrganismo nas diversas concentrações, a técnica de Nested PCR mostrou-se extremamente eficaz, assim como a metodologia ISO, porém com a vantagem de ser mais rápida e de eliminação de vários pontos críticos, comuns às técnicas microbiológicas. Apesar de eficiente as técnicas moleculares não apresentam garantia de que a *Listeria* esteja viável, mas na presente pesquisa isso pode ser comprovado utilizando a metodologia ISO. A técnica foi padronizada utilizando culturas puras de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e oligonucleotídeos LM1 e LM2 para PCR convencional e LisF e LisR para PCR Nested.

Os primers utilizados para a PCR convencional não produziram boa amplificação para os volumes e as concentrações diferenciadas demonstrando baixa sensibilidade para detecção do patógeno. O mesmo não ocorreu na análise realizada por nested PCR onde a amplificação obtida apresentou boa eficiência, pois detectaram todas as amostras em volumes e concentrações diversas, demonstrando assim alta sensibilidade para detecção do microrganismo. Nesta análise a detecção foi possível até com 1 UFC/g de queijo bem como com uma alta concentração de 1000 UFC/g de queijo.

A análise microbiológica mostrou-se eficaz para detecção de *Listeria monocytogenes* independente do nível de contaminação do alimento. Conclui-se que a análise molecular pode reduzir o tempo na detecção de *L. monocytogenes* em

queijo de muito alta umidade podendo esta substituir com eficiência a metodologia microbiológica convencional. A presente pesquisa sugere que a análise molecular possa ser uma ferramenta a ser utilizada pelos serviços de inspeção para detecção de microrganismos em alimentos principalmente os que necessitam de rapidez no diagnostico levando-se em consideração o tempo de prateleira de alguns produtos alimentícios.

## ANEXOS

**Tabela 1** – Resultados das análises realizadas em massas de queijo minas frescal nos diversos volumes e tratamentos através de metodologia ISO, PCR convencional e PCR Nested.

Tratamento	Lote	Dia	ISO Contagem	ISO Detecção	PCR Convencional			PCR Nested		
					1ml	5ml	10ml	1ml	5ml	10ml
0	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-
1	1	0	0	+	-	-	-	+	+	+
10	1	0	0	+	-	-	-	+	+	-
100	1	0	Incontável	+	-	-	-	+	+	-
1000	1	0	Incontável	+	-	-	-	+	+	+
0	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-
1	2	0	0	+	-	-	+	+	+	+
10	2	0	0	+	-	+	+	+	+	+
100	2	0	Incontável	+	-	+	+	+	+	+
1000	2	0	Incontável	+	-	+	+	+	+	+
0	3	0	0	-	-	-	-	-	-	-
1	3	0	0	+	-	-	-	+	+	+
10	3	0	0	+	-	-	-	+	+	+
100	3	0	Incontável	+	-	-	-	+	+	+
1000	3	0	Incontável	+	+	-	-	-	+	+
0	1	5	0	-	-	-	-	-	-	-
1	1	5	0	+	-	-	-	+	+	+
10	1	5	7	+	-	-	-	+	+	+
100	1	5	Incontável	+	-	-	-	+	+	+
1000	1	5	Incontável	+	-	-	-	+	+	-
0	2	5	0	-	-	-	-	-	-	-
1	2	5	0	+	-	-	-	+	+	+
10	2	5	3	+	-	-	-	+	+	+
100	2	5	Incontável	+	-	-	-	+	-	+
1000	2	5	Incontável	+	-	-	+	+	+	+
0	3	5	0	-	-	-	-	-	-	-
1	3	5	0	+	-	-	-	+	+	-
10	3	5	2	+	-	-	-	+	+	+
100	3	5	Incontável	+	-	-	-	+	+	+
1000	3	5	Incontável	+	-	-	-	+	+	+
0	1	10	0	-	-	-	-	-	-	-
1	1	10	3	+	-	-	-	+	+	+
10	1	10	Incontável	+	-	-	-	+	+	+
100	1	10	Incontável	+	-	-	-	+	+	+
1000	1	10	Incontável	+	-	-	-	+	+	+
0	2	10	0	-	-	-	-	-	-	-
1	2	10	10	+	-	-	-	+	+	+
10	2	10	Incontável	+	-	-	-	+	+	+
100	2	10	Incontável	+	-	-	-	+	+	+
1000	2	10	Incontável	+	-	-	-	+	+	+
0	3	10	0	-	-	-	-	-	-	-
1	3	10	7	+	-	-	-	+	+	+
10	3	10	Incontável	+	-	-	-	+	+	+
100	3	10	Incontável	+	-	-	-	+	+	+
1000	3	10	Incontável	+	-	-	-	+	+	+

**Figura 1** – Esquema gráfico de metodologias e tratamentos realizados

