

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO SUL DE  
MINAS GERAIS - IFSULDEMINAS  
POLYANA DE FARIA CARDOSO**

**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE A BIOLOGIA MOLECULAR E A  
BACTERIOLOGIA CONVENCIONAL PARA DETECÇÃO DE *Listeria monocytogenes***

**MACHADO - MG**

**2018**

**POLYANA DE FARIA CARDOSO**

**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE A BIOLOGIA MOLECULAR E A  
BACTERIOLOGIA CONVENCIONAL PARA DETECÇÃO DE *Listeria monocytogenes***

Dissertação apresentada ao IFSULDEMINAS, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Maria O. M. Veiga.

**MACHADO - MG**

**2018**

C266a

Cardoso, Polyana de Faria

Análise comparativa entre a Biologia molecular e a bacteriologia convencional para detecção de Listeria monocytogenes / Polyana de Faria Cardoso. -- Machado: [s.n.], 2018.

43 p.

Orientadora: Profª. Drª. Sandra Maria O. M. Veiga.

Trabalho de Conclusão de Curso (pós-graduação) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais - Campus Machado.

Inclui bibliografia

1. Leite UAT. 2. Listeria. 3. Microbiologia. I Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Machado. II. Título.

CDD: 664

**POLYANA DE FARIA CARDOSO**

**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE A BIOLOGIA MOLECULAR E A  
BACTERIOLOGIA CONVENCIONAL PARA DETECÇÃO DE *Listeria monocytogenes***

Dissertação apresentada ao IFSULDEMINAS, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em     de     de 2018

---

Prof. Dr. Marcos José Marques  
UNIFAL – Campus Alfenas

---

Prof. Dr. Délcio Bueno da Silva  
IF Sul de Minas – Campus Muzambinho

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Maria Oliveira Morais Veiga  
UNIFAL – Campus Alfenas

Dedico esta e todas às minhas demais conquistas aos meus pais Mário e Lia, minhas irmãs Juliana e Morgana, aos meus sobrinhos Matheus e Rafaela, e ao meu esposo, Eduardo, meus melhores e maiores presentes.

## **AGRADECIMENTOS**

Esta dissertação somente chegou ao final pelo apoio imprescindível de várias pessoas.

Não posso deixar de agradecer a minha orientadora, Professora Doutora Sandra Maria Oliveira Morais Veiga, por toda a paciência e empenho com que sempre me orientou neste trabalho. Muito obrigada por ter me corrigido quando necessário, sem nunca desmotivar-me. Obrigada ao meu co-orientador Fábio Antônio Colombo, pela paciência e disposição em ensinar e ajudar.

Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas da primeira turma do Mestrado em Ciências dos Alimentos: Bruna, Danielle, Dayla, Leilane, Maria Clara e Mariana, especialmente a Talita, Maurílio e Janaina, cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos.

Por último, quero agradecer a minha família e amigos pelo apoio incondicional que me deram, especialmente aos meus pais, irmãs e meu esposo.

Agradeço imensamente ao Instituto Federal do Sul de Minas - IF, ao campus de Muzambinho e Machado pelo apoio financeiro, intelectual e material. E a Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL pela disponibilização do espaço e pessoal, necessários para a realização das pesquisas e técnicas utilizadas ao longo da pesquisa para a conclusão deste trabalho.

E por fim, meu agradecimento a todos aqueles que de uma maneira ou de outra, contribuíram para que este percurso pudesse ser concluído.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

*José de Alencar*

## RESUMO

A *Listeria monocytogenes* é responsável por provocar a listeriose, que tem como principais manifestações clínicas: infecção inicial semelhante a um resfriado, com febre baixa, cefaleia, calafrios e mal-estar geral, podendo progredir para meningite, meningocéfalite, septicemia, aborto ou parto prematuro. A taxa de mortalidade encontra-se na faixa de 20-30% dos casos diagnosticados. Os grupos mais susceptíveis, considerados grupos de risco, são mulheres grávidas (e seus fetos), crianças, idosos e indivíduos com o sistema imunológico comprometido. No Brasil, a *Resolução RDC ANVISA/MS n.º 12, de 02 de janeiro de 2001*, estabelece os padrões microbiológicos para produtos alimentícios expostos à venda, sendo que o micro-organismo *L. monocytogenes* deve estar ausente em 25g do alimento. A bacteriologia convencional para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* em alimentos é complexa, envolve duas ou até três formas de enriquecimento das amostras e mesmo assim, muitas vezes, têm-se resultados frustrados. Assim, este projeto teve o objetivo de validar a técnica de biologia molecular tradicional (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) para detecção de *Listeria monocytogenes* em leite UAT (ultra alta temperatura) e compará-la com a bacteriologia convencional. Para tanto, 144 amostras de leite estéreis foram artificialmente contaminadas com cepas padrões *L. monocytogenes* e analisadas, sob a forma de *pool*, pelas duas metodologias. Além disso, foram preparados controles positivos e negativos. O experimento teve quatro tempos de repetição e foi conduzido em triplicata. Os resultados obtidos pela metodologia da bacteriologia convencional são mais assertivos quando se quer uma análise qualitativa e quantitativa; a técnica de biologia molecular torna-se interessante para a análise qualitativa, detectando a contaminação pelo micro-organismo, mesmo em pequenas quantidades. Em seguida, verificou-se a aplicabilidade das duas técnicas propostas e adicionou-se a metodologia PCR *Real Time* para a pesquisa do micro-organismo estudado em 90 amostras de leite UAT, de 10 diferentes marcas, oriundas do comércio regional. O experimento teve três tempos de repetição e foi conduzido em triplicata. Ao analisar as amostras, sob a forma de 10 *pool*, apenas a metodologia PCR *Real Time* conseguiu detectar *L. monocytogenes* em uma das marcas analisadas.

**Palavras-chave:** *Listeria*; Leite UAT; Microbiologia; Biologia Molecular.



## ABSTRACT

*Listeria monocytogenes* is responsible for causing listeriosis, which has the following clinical manifestations: initial infection similar to a cold, with a low fever, headache, chills and general malaise, and may progress to meningitis, meningocephalitis, septicemia, abortion or parturition premature. The mortality rate is in the range of 20-30% of diagnosed cases. The most susceptible groups, considered at-risk groups, are pregnant women (and their fetuses), children, the elderly, and individuals with compromised immune systems. In Brazil, Resolution RDC ANVISA / MS No. 12, of January 2, 2001 establishes the microbiological standards for food products exposed to the sale, and the microorganism *L. monocytogenes* should be absent in 25g of the food. Conventional bacteriology for the detection of *L. monocytogenes* in food is complex, involves two or even three forms of enrichment of the samples and even then, many times, frustrated results have been obtained. The aim of this project was to validate the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique for the detection of *L. monocytogenes* in Ultra High Temperature (UHT) milk and to compare it with conventional bacteriology. For this, 144 samples of sterile milk were artificially contaminated with standard strains *Listeria monocytogenes* and analyzed as a pool by the two methodologies. In addition, positive and negative controls were prepared. The experiment had four replicate times and was conducted in triplicate. The results obtained by the methodology of conventional bacteriology are more assertive when a qualitative and quantitative analysis is required; the technique of molecular biology becomes interesting for the qualitative analysis, detecting the contamination by the microorganisms, even in small amounts. Then, the applicability of the two proposed techniques was verified and the Real Time PCR methodology was used to investigate the microorganism studied in 90 UAT milk samples from 10 different brands from the regional trade. The experiment had three replicate times and was conducted in triplicate. When analyzing the samples as a pool, only the Real Time PCR methodology was able to detect *L. monocytogenes* in one of the analyzed brands.

**Keywords:** *Listeria*; Milk UHT; Microbiology; Molecular biology.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>9</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Listeria spp.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Listeriose.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3 Bacteriologia convencional e biologia molecular .....</b>	<b>17</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>26</b>
<b>ARTIGO .....</b>	<b>26</b>

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria em forma de bacilo curto (0,4µm a 0,5µm de diâmetro e 0,5µm a 2µm de comprimento), Gram positivo, não esporulado presente em alimentos, causador da doença denominada listeriose. Apesar de pouco incidente, é responsável por graves complicações como meningite, septicemia e casos de aborto, apresentando um alto índice de mortalidade na população de risco, que inclui gestantes, recém-nascidos, idosos e imunodeficientes ou imunossuprimidos. Desde a década de 1980, quando a doença também foi relatada em humanos, vários estudos vêm demonstrando sua presença no leite e derivados, inclusive no leite pasteurizado e subprodutos. O micro-organismo apresenta crescimento em uma ampla faixa de temperatura (1°C – 45°C) e pH (4.3 – 9.6) e tolera concentrações salinas elevadas ( $\geq 10\%$ ), são móveis a temperatura de 25°C (FRANCO; LANDGRAF, 2008; JAY, 2005). Atualmente, são conhecidas seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* e *L. ivanovii*. Sendo que entre as seis espécies conhecidas, somente a *L. monocytogenes* é considerada patogênica para seres humanos. A listeriose é uma doença caracterizada por um conjunto de fatores causados pela bactéria *Listeria monocytogenes* como a septicemia, meningite, encefalite e infecção cervical ou intra-uterina. Normalmente, não é diagnosticada devido à característica de ser assintomática, sendo então, subnotificada (FRANCO; LANDGRAF, 2008; JAY, 2005). O principal reservatório deste micro-organismo é o solo, lodo, forragem e água, estando associada à queijos, leite, carnes, peixes, frutos do mar, entre outros; o que justifica o principal modo de transmissão, a ingestão de leite contaminado, queijos, água, frutos do mar, legumes crus, dentre outros alimentos, e assim, por esse motivo é considerada uma Doença Transmissível por Alimento (DTA), (FRANCO; LANDGRAF, 2008; JAY, 2005).

A listeriose ficou em evidência na década de 1980, como zoonose transmitida por alimentos, depois de várias ocorrências na América do Norte e na Europa, no entanto, desde 1929 a *L. monocytogene* já era conhecida como agente da listeriose (LINNAN *et al.*, 1988). Principalmente em países industrializados, a ocorrência de listeriose de origem alimentar é relatada, já em países em desenvolvimento, há poucos, ou nenhum relato. Em relação a estes dados, não se pode afirmar que não existem sistemas de pesquisa e informação ou se existem

diferentes taxas de exposição, hábitos alimentares e susceptibilidade do hospedeiro ao micro-organismo. No Brasil, as informações sobre Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são bastante escassas. Um estudo realizado no Estado do Paraná revelou que no ano de 2000 foram gastos pelo governo cerca de 2 milhões de reais, somente em internações devido às DTA. (AMSON, 2006).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) adota a Resolução RDC nº 12 de janeiro de 2001 que estabelece a ausência do patógeno *L. monocytogenes* em 25 g de amostra de alimento (BRASIL, 2001).

O método utilizado para identificação do micro-organismo *L. monocytogenes*, é a cultura, baseada em pré-enriquecimento seletivo, enriquecimento e plaqueamento. Isto é seguido pela caracterização de *Listeria* sp. usando morfologia de colônia, fermentação de açúcar e propriedades hemolíticas. Embora um resultado negativo pelo método microbiológico convencional possa ser confirmado em torno de 4 dias, o tempo para um resultado positivo é geralmente de 5 a 7 dias, a partir da coleta da amostra. No entanto, como não é viável para a indústria manter produtos alimentícios por 7 dias antes da distribuição, torna-se necessário o aprimoramento de métodos mais rápidos para a detecção de *L. monocytogenes* (JANZTEN *et al.*, 2006).

Visando reduzir o tempo de espera e o erro na identificação bacteriana convencional, métodos moleculares estão auxiliando e até mesmo substituindo alguns métodos convencionais, no monitoramento da fabricação de alimentos de origem animal (ANDRADE *et al.*, 2010). Pode-se destacar a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), pela precisão e rapidez. A PCR vem sendo utilizada tanto na identificação de *L. monocytogenes* quanto de diversos outros micro-organismos no controle microbiológico de alimentos (KIM, *et al.*, 2014).

A validação entre o método convencional e a técnica de PCR, se faz muito necessária, pois toda vez que o micro-organismo é detectado pela biologia molecular, o resultado deve ser confirmado pela metodologia convencional para atender as exigências do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2016).

A finalidade deste estudo, foi estudar principalmente a metodologia microbiológica convencional e a biologia molecular para detecção e quantificação de *Listeria monocytogenes* em leite UAT (Ultra Alta Temperatura).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 LISTERIA spp

*Listeria* são bactérias amplamente distribuídas em diferentes ambientes e áreas (HAMON; HÉLÈNE; COSSART, 2006). Composto por mais de quinze espécies, agrupados em dois grupos *Listeria sensu stricto* (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. marthii*) e *Listeria sensu lato* (*L. fleischmannii*, *L. Grayi*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. booriae*, *L. newyorkensis*) (ORSI; WIEDMANN, 2016), somente *L. monocytogenes*, um agente patógeno transmitido por alimentos, representa uma ameaça significativa para a saúde pública (BATZ *et al.*, 2005) (BATZ *et al.*, 2005; GILLESPIE *et al.*, 2010; PAINTER *et al.*, 2013).

A separação nesses dois grupos, baseia-se na relação das espécies com *L. monocytogenes*, classificadas em grupos mais importantes em termos de saúde pública e impacto econômico (ORSI; WIEDMANN, 2016).

Caracterizada por micro-organismos que se apresentam na forma de bastonetes Gram-Positivos de extremidade arredondada, não esporulados, anaeróbicos facultativos, móveis por flagelos, que crescem em temperaturas de diversos ambiente, a *Listeria* pode ainda se multiplicar lentamente em temperaturas de refrigeração (FORSYTHE, 2010). Alguns autores discutem sua motilidade em função da temperatura acima de 37° C, resultando em diminuição da sua motilidade em função da não expressão do flagelo nesse ambiente (WAY *et al.*, 2004).

Os micro-organismos desse gênero, são comumente encontrados em águas residuais, rios, solos, plantas, particularmente em material vegetal em decomposição e ambiente secos e úmidos (SAUDERS; WIEDMANN, 2007). Existindo também diversas formas de contaminação através de animais, poeira, do ar, insetos, das fezes, por meio da ingestão de alimentos ou em contato com outras pessoas (JAY, 2015).

A faixa de pH ideal para crescimento dessa bactéria está entre 5,6 a 9,6, requerendo nutrientes específicos para o seu crescimento, como os aminoácidos cisteína, glutamina, isoleucina e valina além das vitaminas biotina, riboflavina e tiamina (JAY, 2005).

Apresenta reação positiva para catalase e negativa para oxidase, teste positivo para vermelho de metila, produzem amônia a partir de arginina, podendo também crescer na

presença de 10 % ou até 40 % de bile. Possuem a capacidade de hidrolisar esculina, salicina, e hipurato de sódio, reagindo negativamente para produção de sulfeto de hidrogênio, indol e nitrato redutase (JAY, 2005).

## 2.2 Listeriose

O relatório de síntese da União Europeia sobre tendências e fontes de zoonoses, agentes zoonóticos e surtos de alimentos, informou que a maioria das fortes manifestações de surtos alimentares, foram associadas a gêneros alimentícios de origem animal, incluindo os produtos lácteos. Em 2013, 2,14% dos focos de origem alimentar (18 em 839 surtos) foram atribuídos ao consumo de queijos e produtos lácteos (EFSA, 2013). De 1982 a 2010, foram relatados sessenta e quatro casos e surtos humanos na Europa, nos Estados Unidos e no Canadá relacionados ao consumo de produtos lácteos (DALZINI *et al.*, 2016).

Até 1980 a *L. monocytogenes* foi considerado um patógeno animal. Posteriormente, a listeriose, surgiu como uma doença humana, descoberta por meio de surtos em locais específicos. *L. monocytogenes* é um patógeno intracelular responsável pela doença de origem alimentar denominada listeriose, com capacidade de penetrar e multiplicar-se dentro do citoplasma da célula do hospedeiro (macrófagos, fibroblasto, eritrócitos) e invadir células adjacentes, além de se proteger do sistema imunológico do hospedeiro (MONTEIRO *et al.*, 2013).

*L. monocytogenes* pode resistir a desinfetantes, formar biofilmes e sobreviver ou multiplicar sob características físico-químicas extremas, tais como ambientes secos, diferentes temperaturas, uma ampla gama de pH e altas concentrações de sal (MARTINEZ-RIOS; DALGAARD, 2018). Todas estas condições promovem a sobrevivência e a proliferação de *L. monocytogenes* em uma grande variedade de matrizes de alimentos, incluindo produtos lácteos, produtos à base de carne, frutos do mar, vegetais e ambientes de alimentos. Podendo ocorrer a contaminação de produtos alimentares com este patógeno, durante a produção, embalagem, transporte e armazenamento (XUAN *et al.*, 2017).

São 14 os sorotipos de *L. monocytogenes* descritas com base nos antígenos somáticos e flagelares e identificadas pelo esquema alfa-numérico (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4bx, 4b, 4c, 4d, 4e, 7). Dentre essas, cabe destacar os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b, responsáveis por 90% dos casos de listeriose humana. Estas estirpes são, na sua maioria, quase todas isoladas de

alimentos, sendo que o sorotipo 4b é identificado em 50% destes (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

Na década de 1980, a listeriose ficou conhecida como uma importante zoonose transmitida por alimentos, depois de várias ocorrências na América do Norte e na Europa: no entanto, desde 1929, a *L. monocytogenes* já era conhecida como agente da listeriose (LINNAN *et al.*, 1988).

Os sintomas típicos dessa doença incluem: septicemia, abortos e encefalite (MCLAUCHLIN; REES, 2009). Sendo relatados alguns casos em que a infecção por *L. monocytogenes* de humanos, levou a doenças gastrointestinais sem acometimento sistêmico (AURELI *et al.*, 2000; FRYE *et al.*, 2002).

A listeriose apresenta duas manifestações clínicas distintas, a forma invasiva e a não-invasiva (gastrointestinal). Na forma invasiva, é uma doença severa, pois a taxa de mortalidade é alta, entre 20% a 30%, principalmente, para pessoas susceptíveis a adquirir a infecção, como gestantes, recém-nascidos, idosos, pacientes submetidos à hemodiálise, a terapias prolongadas e indivíduos com sistema imunológico deprimido (SWAMINATHAN, 2001). Já a forma não-invasiva, pode causar infecções brandas, semelhantes a uma gripe, até surtos de gastroenterite febril em indivíduos saudáveis, mas normalmente não evolui para óbito (CARRIQUE-MAS *et al.*, 2003; GAHAN; HILL, 2005).

As primeiras ocorrências registradas de listeriose, ocorreram na Alemanha Oriental, entre as décadas de 1940 a 1950, associadas ao consumo do leite e seus derivados, onde, com mulheres grávidas que apresentaram aborto ou parto prematuro, foram relacionados a essa doença (GRAY; KILLINGER, 1966).

Os casos de doenças humanas e os surtos causados por este organismo, têm um impacto econômico considerável para a sociedade e para a indústria de alimentos (IVANEK, *et al.*, 2004). Além disso, a indústria de alimentos e as agências reguladoras, em todo o mundo, realizam uma grande quantidade de testes para detectar a presença de *L. monocytogenes* (ORSI; WIEDMANN, 2016).

Cada país tem sua regulamentação para o controle de *L. monocytogenes* nos alimentos. Nos Estados Unidos, a legislação é mais rígida, considerando a política de zero contaminação de modo que, a presença do micro-organismo em 25g de qualquer alimento pronto para o consumo, é considerada como inaceitável, caracterizando-o como impróprio para o consumo (CHEN *et al.*, 2003).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da RDC12/2001, estabelece os padrões microbiológicos para os alimentos, exigindo a ausência de *L. monocytogenes* em 25 g, em cinco amostras do produto de um mesmo lote, somente para os queijos de média, alta a muito alta umidade. Para os demais produtos prontos para o consumo, não são contemplados limites específicos para essa bactéria (BRASIL, 2001).

Em 2010-2011, uma pesquisa de base da União Europeia (EFSA, 2013) coletou dados sobre a presença de *L. monocytogenes* para diferentes categorias de alimentos prontos para consumo. A proporção de amostras positivas de *L. monocytogenes* foi maior nos produtos de peixe (principalmente peixes defumados), seguido de queijos macios e semi-macios e produtos de carne.

A dose mínima infectante de *L. monocytogenes* é ainda desconhecida, devido à impossibilidade de se realizar pesquisas com voluntários saudáveis, à variação da suscetibilidade e condição imunológica do hospedeiro e à variabilidade na virulência do patógeno. No entanto, informações sobre a população de *L. monocytogenes* em alimentos contaminados envolvidos em surtos, indicam que populações entre  $10^3$  e  $10^4$  UFC/g em alimento são responsáveis pelo desencadeamento da doença (DUFFY *et al.*, 1999).

Vários surtos de listeriose podem ser observados pelo mundo, derivado de produtos lácteos. Bula *et al.*, (1995), no oeste da Suíça, descreveram 57 casos de listeriose ocorridos em adultos durante um surto associado ao consumo de produtos de origem láctea. No geral, 42% dos pacientes apresentam doença subjacente e 54% tinham acima de 65 anos de idade, onde, 21% dos casos eram de bacteremia, 40% eram de meningite e 39% de meningoencefalite.

Linnan *et al.*, (1988) relataram 142 casos de listeriose humana de 1 de janeiro a 15 de agosto de 1985 em Los Angeles, Califórnia, causada pela ingestão de derivados lácteos contaminado por um tipo fago de *L. monocytogenes* sorotipo 4b. Sendo que 93 casos (65%) ocorreram em mulheres grávidas e 49 (34,5%) em adultos não grávidas, tendo a ocorrência de 48 mortes, sendo 20 fetos, 10 neonatos e 18 adultos não grávidas. Dos adultos não grávidas, 98% (48 de 49) tinham uma condição de predisposição conhecida.

Na França ocorreu um surto de listeriose devido ao consumo de queijo produzido com leite cru, onde vinte pessoas foram acometidas, sendo que onze eram gestantes, resultando em dois abortos, quatro partos prematuros e duas mortes fetais. Outro surto ocorreu novamente em Paris na França, no ano de 2000, devido à ingestão de língua de porco defumada, onde ocorreram sete óbitos. A fábrica retirou do comércio todos os seus produtos após ter sido



detectado a presença de *L. monocytogenes* nas línguas, cabeças e diversos embutidos de carne (DOROZYNSKI, 2000).

Boggs *et al.*, (2001) na Carolina do Norte, Estados Unidos, relataram um surto de listeriose humana, em que 12 pessoas foram acometidas devido à ingestão de produtos lácteos a base de queijo comprado de supermercados locais ou de vendedores ambulantes. Dos pacientes envolvidos, 11 eram mulheres com idade média de 21 anos e um era homem, com 70 anos, o qual se apresentava imunodeprimido. Das 11 mulheres, 10 eram gestantes e a infecção com *L. monocytogenes* resultou em cinco natimortos, três partos prematuros e dois neonatos infectados após o nascimento.

Koch *et al.*, (2010) registraram surtos de listeriose feito a partir de leite pasteurizado na Alemanha no período de outubro de 2006 a fevereiro de 2007. A estirpe deste surto de *Listeria monocytogenes* foi identificada em seres humanos e amostras de queijo. Durante o período do mesmo surto, 189 pacientes foram afetados, sendo 97% acima do número médio de casos para o respectivo período de tempo dos anos de 2002 a 2005.

Fretz *et al.*, (2010) relataram um surto de listeriose na Áustria e na Alemanha devido ao consumo de produtos de origem láctea, compreendendo 14 casos (incluindo cinco fatalidades) infectados por *L. monocytogenes* de sorotipo 1/2a (clone 1), com início dos casos em junho de 2009 e duração até 2010. Uma segunda estirpe de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a (clone 2) se espalhou por este produto, podendo ser associado a mais 13 casos na Áustria (dois fatais), seis na Alemanha (um fatal) e um caso na República Tcheca, com início da doença de dezembro de 2009 e duração até o final de fevereiro de 2010.

Em Portugal, Magalhaes *et al.*, (2015), em estudos envolvendo 25 hospitais nacionais levou à detecção de um surto de listeriose que ocorreu entre março de 2009 e fevereiro de 2012. A quantidade de tempo entre o início do surto e a sua detecção foi de 16 meses. Dos 30 casos de listeriose relatados, 27 estavam na região de Lisboa e Vale do Tejo. Dois casos foram infecções maternas/neonatais e um resultou em perda fetal. A idade média dos casos não maternos/neonatais foi de 59 anos, com 13 casos acima de 65 anos. A taxa de mortalidade por caso foi de 36,7%. Pesquisas colaborativas com as autoridades nacionais de saúde e segurança alimentar identificaram o queijo como a provável fonte de infecção.

No Brasil, foram confirmados por meio de cultura, três casos de meningite por *L. monocytogenes* do sorotipo 4b e 1/2a no Distrito Federal. Estes pacientes pertenciam aos grupos de risco, sendo um bebê com 10 dias de vida, uma criança com 8 anos e uma mulher de 35 anos

portadora de lúpus eritematoso sistêmico, que veio a óbito (HOFER; NASCIMENTO; OLIVEIRA, 1998).

Em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, no Hospital de Clínicas, durante o ano de 2000, foram realizadas coletas de dez placentas provenientes de abortos ou partos prematuros. A partir de análise microscópica e avaliação imuno-histoquímica, foi observado que 50% das amostras analisadas foram positivas para *L. monocytogenes*. Estes resultados demonstram que o micro-organismo é uma importante causa de aborto e parto prematuro no Rio Grande do Sul, sendo possível realizar um diagnóstico rápido para listeriose e contribuir para o tratamento de neonatos (SCHWAB; EDELWEISS, 2003).

Ramos e Costa (2003), observaram a ocorrência de *Listeria* sp. em queijo artesanal tipo coalho, comercializado na cidade de Manaus, no período de março a maio de 1998. Foram coletadas 58 amostras do produto em feiras e mercados localizados em seis zonas da cidade de Manaus. Em duas amostras de queijo foram identificadas duas espécies do micro-organismo: *L. monocytogenes* e *L. innocua*. Os resultados apresentados demonstraram haver risco de transmissão de enfermidades pelo consumo de queijos processados sem os devidos cuidados de higiene.

Lundén, Autio e Korkeala (2002), testando a capacidade de aderência e subsequente formação de biofilmes por cepas de *L. monocytogenes*, verificaram que cepas persistentes, ou seja, aquelas que são repetidamente isoladas de um determinado local, são de 2 a 11 vezes mais aderentes ao aço inoxidável do que aquelas não persistentes, constatando assim, que as cepas persistentes são capazes de se adaptar ao meio mais rapidamente que as outras. Borucki et al. (2004) também verificaram a maior capacidade de cepas persistentes em formar biofilmes.

Na indústria de laticínios, os procedimentos inadequados de higiene, limpeza e de sanificação dos equipamentos, bem como a microbiota contaminante do ambiente de processamento, são considerados as principais causas de contaminação dos produtos por micro-organismos deteriorantes e patogênicos (SOLER; PONSELL; PAZ, 1995). A presença de micro-organismos acumulados sob a forma de biofilmes, em superfícies de contato com os alimentos, pode levar à contaminações antes e após o processamento, causando deteriorações ou enfermidades de origem alimentar (ZOTTOLA, 1994; 1997; AUSTIN; BERGERON, 1995). As células em biofilmes são, no mínimo, 500 vezes mais resistentes a agentes antibacterianos (COSTERTON *et al.*, 1995).

Com isso, a capacidade da pasteurização do leite em destruir a *L. monocytogenes* passou a ser questionada, particularmente devido aos ensaios experimentais efetuados não terem

reproduzido a condição intracelular observada nos casos naturais, em que as *Listerias* são eliminadas pelo leite no interior de macrófagos. Novos experimentos foram realizados, corrigindo esse viés. E a conclusão foi a de que a pasteurização é eficaz, porém, os surtos registrados com leite pasteurizado ou produtos lácteos produzidos com leite pasteurizado, foram decorrentes de contaminação estabelecida após a pasteurização (EIROA, 1990). Portanto, a busca por métodos de detecção para *L. monocytogenes* é de grande importância para a segurança alimentar.

### **2.3 Bacteriologia convencional e biologia molecular**

Em todo o mundo, a contaminação de alimentos continua a ser uma grande preocupação para a saúde pública, consumidores, agências reguladoras e indústrias de alimentos (GIAOURIS, *et al.*, 2014). A ocorrência de infecções alimentares ocasionadas por *L. monocytogenes* é um problema mundial de saúde pública (AMAJOUD, *et al.*, 2018). Devido a esse fato, há necessidade de controle da presença desse agente em alimentos, principalmente naqueles de origem animal. Portanto, para avaliar a sua potencial presença e garantir a segurança alimentar, é de grande importância a busca de métodos eficazes para essa avaliação de contaminantes alimentares.

A adoção de determinado método de análise, depende de vários fatores que devem ser considerados, como o tempo gasto para obtenção dos resultados, a praticidade da técnica, o custo dos reagentes, o limite de detecção, a precisão, a sensibilidade, a especificidade, a acurácia da técnica, dentre outros (MATA, 2009).

A metodologia de avaliação por meio da bacteriologia convencional, recebe essa denominação porque foi desenvolvida há muitos anos e desde então, vem sendo empregada como método oficial na maioria dos laboratórios brasileiros e também em outros países. Esses métodos estão descritos em publicações consideradas de referência e, internacionalmente aceitas (GREGHI, 2005).

Segundo Franco e Langraf (2005), dentre essas publicações destacam-se o Bacteriological Analytical Manual (1992) publicado em conjunto pela United States Food and Drug Administration (FDA) e Association of Official Analytical Chemists International (1992), o Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, inicialmente editado pela American Public Health Association (APHA) e na edição mais recente por

Vanderzant e Splittstoesser (1992) e o *Microorganisms in foods- their significance and methods of enumeration* (1978), publicado pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF).

Contudo, os métodos convencionais para isolamento de *Listeria* spp. a partir de alimentos, são complexos e demorados para emitir um resultado positivo, sendo geralmente necessários de cinco a sete dias, envolvendo procedimentos de pré-enriquecimento e/ou enriquecimento, semeadura em meios seletivos diferenciais e caracterização bioquímica e sorológica (GERMANO; GERMANO, 2008).

A Biologia Molecular representa na atualidade uma das áreas de maior potencial para a realização de pesquisas nas áreas de saúde, meio ambiente e alimentos, considerando-se não apenas sua grande relevância clínica e epidemiológica, mas também pela possibilidade de aplicação de ferramentas recentemente desenvolvidas a um número bastante amplo de doenças (PINHO, 2006).

Conhecida como método rápido de avaliação, devido a agilidade na obtenção de resultados, a Biologia Molecular possibilita que lotes de alimentos sejam fornecidos ao consumo em um tempo menor, levando assim, a diminuição das perdas e gastos no armazenamento de produtos alimentícios (MALORNY *et al.*, 2003).

O uso de métodos moleculares pode abreviar o tempo de identificação dos métodos tradicionais. Para isto, dentro da microbiologia molecular, a técnica de amplificação do DNA denominada como reação em cadeia pela polimerase (PCR), permite a replicação *in vitro* e em larga escala apenas do segmento de DNA do micro-organismo em estudo (PINHO, 2006). Essa tecnologia tem sido empregada para detectar *L. monocytogenes* em diferentes tipos de alimentos, incluindo leite e derivados (AZNAR; ALARCÓN, 2003; RIJSENS; HERMAN, 2004).

Peres *et al.*, (2010) padronizaram a técnica de PCR para a identificação de *L. monocytogenes*, testando três pares de oligonucleotídeos iniciadores, dois para a amplificação do gene da listeriolisina O e um para o gene *iap* (invasion-associated protein). Os melhores resultados foram obtidos com um par de oligonucleotídeos que amplifica o gene da listeriolisina O, o qual se mostrou sensível e específico para *L. monocytogenes*.

Peres *et al.*, (2010) avaliaram a possibilidade de empregar a técnica de PCR para a detecção de *L. monocytogenes* diretamente do caldo de enriquecimento de amostras de leite contaminadas artificialmente com essa bactéria. Os autores concluíram que a técnica de PCR não foi eficiente para a detecção de *L. monocytogenes* diretamente do caldo de enriquecimento

(LEB). Entretanto, foi eficiente para a identificação da bactéria oriunda da colônia suspeita em meio seletivo (Oxford e Palcam), possibilitando sua identificação definitiva em apenas algumas horas.

Amajoud *et al.*, (2018), no noroeste de Marrocos, em um total de 1096 amostras de alimentos, foram comprados para examinar a presença de *Listeria* spp. pelo método PCR. Oitenta (7,3%) das amostras testadas foram encontradas positivas para a presença de *Listeria* spp. Enquanto que *L. monocytogenes* foi detectado em 16 (1,5%) amostras. Esse estudo foi o primeiro a caracterizar *L. monocytogenes* estirpes de Marrocos no nível genômico, destacando-se a importância de monitorar a disseminação deste patógeno e de reduzir a exposição da população a *L. monocytogenes*.

Li *et al.*, (2018) avaliaram a eficácia da paenibacterina na inibição da formação do biofilme de *L. monocytogenes*, bem como na remoção do mesmo, por meio do método de PCR em tempo real, da seguinte forma: a 95 °C, durante 10 s, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 5s, 55 °C durante 15s e 72° C durante 30s. Os autores demonstraram que é viável controlar a capacidade de *L. monocytogenes* em formar biofilmes, tratando superfícies com pequenas concentrações de paenibacterina, sugerindo que a mesma, pode ser útil na prevenção de contaminação de alimentos e infecções humanas.

Castro *et al.*, (2017) estudaram a ocorrência e o potencial de crescimento da contaminação de *L. monocytogenes* de baixo nível durante a distribuição e armazenamento de leite cru embalado, usando o método PCR. A ocorrência geral de *Listeria* spp. foi de 6,7% para o leite cru engarrafado, 3,5% para o leite em tanque a granel, 57% para as meias de filtro de leite em linha e 8,0% para as amostras ambientais das instalações de embalagem. Dos 105 frascos de leite cru examinados, cinco (4,8%) foram positivos para *L. monocytogenes*. Os autores concluíram que a contaminação de *L. monocytogenes* de baixa concentração ( $\leq 13$  UFC/ml) ocorre frequentemente no leite em massa (queijo) e no leite cru engarrafado. E que essa contaminação leva ao seu crescimento no leite cru armazenado nas temperaturas típicas de armazenamento do consumidor.

Apesar de existirem vários trabalhos na literatura que detectaram a contaminação por *Listeria* spp em alimentos de origem animal e vegetal por meio do método PCR, poucas pesquisas têm relatado a contaminação em leite UHT, assim como a comparação e validação dos métodos de avaliação convencionais e moleculares por meio da técnica PCR.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMAJOUD, N.; LECLERCQ, A.; SORIANO, J. M et al. Prevalence of *Listeria* spp. and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from food products in Tetouan, Morocco. **Food Control**, v. 84, p. 436–441, 2018.
- AMSON, G. V. et al. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná - Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciencê. Agrotec.**, v.30, n.6, p.1139-1145, 2006.
- ANDRADE, R; GEMELLI, T; ONDER, L. P. D. et al. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.4, p.741-750, out./dez., 2010. Disponível em: [www.biologico.sp.gov.br > uploads > docs > arq > v77\\_4 > andrade](http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v77_4/andrade). Acesso em: 09 ago. 2019.
- AURELI, P.; FIORUCCI, G. C.; CAROLI, D. et al. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. **The New England Journal of Medicine**. v. 342, p. 1236–1241, 2000.
- AUSTIN, J. W.; BERGERON, G. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *Journal of Dairy Research*, New York, v. 62, n. 3, p. 509-519, 1995´
- AZNAR, R.; ALARCÓN, B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. **J Appl Microbiol**, Valencia, v. 95, n. 5, p. 958–966, 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2672.2003.02066.x>. Acesso em:
- BATZ, M. B.; DOYLE, M. P.; MORRIS, J. G. et al., Attributing illness to food. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l], v. 11, n. 7, p. 993-999, July, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3371809/>. Acesso em: 20 ago. 2019.
- BOGGS, G. D.; WHITWAM, R. E.; HALE, L. M. et al. **Outbreak of Listeriosis associated with homemade mexican-style cheese**. North Carolina: Morbidity and Mortality weekly report, 2001. v. 50. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/531f/1a70162f3a7b3a151d14ba05627885ebe8ff.pdf>. Acesso em:
- BORUCKI, M. K.; REYNOLDS, J.; GAY, C. C. et al. Dairy farm reservoir of *Listeria monocytogenes* sporadic and epidemic strains. **Journal of Food Protection**, Whashington, v. 67, n. 11, p. 2496–2499, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15553633>. Acesso em:
- BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 2 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília: República Federativa do Brasil, 2001.
- BÜLA, C. J.; BILLE, J.; GLAUSER, M. P. An epidemic of food-borne listeriosis in western Switzerland: Description of 57 cases involving adults. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 66–72, 1995. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-abstract/20/1/66/358550?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em:

BRASIL. DOC SAC/CGAL n° 04: Escopo da Área de Microbiologia em Alimentos e Água - Revisão 10. Brasília: Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento, 2016.

CARRIQUE-MAS, J. J.; HÖKEBERG, I.; ANDERSON, Y. et al. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese – an outbreak of listeriosis? **Epidemiology and Infection**, v. 130, n. 1, p. 79–86, 2003.

CASTRO, H.; RUUSUNEN, M.; LINDSTRÖM, M. Occurrence and growth of *Listeria monocytogenes* in packaged raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, Finland. v. 16, n. 261, p. 1–10, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28850852>. Acesso em:

CHEN, Y.; ROSS, W. H.; SCOTT, V. N.; et al. *Listeria monocytogenes*: Low Levels Equal Low Risk. **Journal of food protection**, v. 66, n. 4, p. 570–577, 2003. DISPONÍVEL EM: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12696678>. Acesso em:

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, Bozeman, v. 49, p. 711–745, 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8561477>. Acesso em:

DALZINI, E.; BERNINI, V.; BERTASI, B. Survey of prevalence and seasonal variability of *Listeria monocytogenes* in raw cow milk from Northern Italy. **Food Control**, v. 60, p. 466–470, Fev., 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515301547?via%3Dihub>. Acesso em: 9 ago. 2019.

DOROZYNSKI, A. Seven die in French listeria outbreak. **British Medical Journal**, v. 320, p. 601, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1117648/>. Acesso em:

DUFFY, G.; CLOAK, O. M.; SHERIDAN, J. J. et al. The development of a combined surface adhesion and polymerase chain reaction technique in the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry. **Int J Food Microbiol**. v. 49, n. 3, p. 151–159, 1999. Disponível em: <https://europepmc.org/abstract/med/10490225>. Acesso em:

EFSA. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. **EFSA Journal**, Parma, v. 11, n. 6, p. 3241, 2013. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2013.3241>. Acesso em: 20 ago. 2019.

EIROA, U. M. N. *Listeria monocytogenes* – Características, ocorrência e desenvolvimento em alimentos. **Coletânea ITAL**. Campinas, v. 20, n. 1, p. 13–22, 1990.

FORSYTHE, S. J. **The Microbiology of Safe Food**. 2. Ed. Chischester: Wiley, Blackweel, 2010.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

FRETZ, R.; PICHLER, J.; SAGEL, U. et al. Update: Multinational listeriosis outbreak due to “quargel”, a sour milk curd cheese, caused by two different *L. monocytogenes* serotype 1/2a strains, 2009-2010. **Eurosurveillance**, Alemanha, v. 15, n. 5, p. 2–3, 2010. Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.15.16.19543-en>. Acesso em:

FRYE, D. M.; ZWEIG, R.; STURGEON, J. et al. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with delicatessen meat contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 8, p. 943–9, 2002.

GAHAN, C. G. M.; HILL, C. A. A review: Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n.6, p. 1345–1353, 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2005.02559.x>. Acesso em: 20 ago. 2019.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Ed. Varela, 2008.

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; HÉBRAUD, M. et al. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **Meat Science**, Greece, v. 97, n. 3, p. 289–309, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23747091>. Acesso em:

GILLESPIE, I. A.; MOOK, P.; LITTLE, C. L. et al. Human listeriosis in England, 2001-2007: association with neighbourhood deprivation. **Euro surveillance**. [S, l.], v. 15, n. 27, p. 7–16, 2010. Disponível em: [www.eurosurveillance.org](http://www.eurosurveillance.org). Acesso em: 13 dez. 2017.

GRAY, M. L.; KILLINGER, A. H. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. **Bacteriol Rev**, v. 30, N. 2, p. 309–382, 1966. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC440999/>. Acesso em:

GREGHI, S. de Q. Avaliação da eficiência de métodos rápidos usados para detecção de coliforme totais e coliforme fecais em amostras de água, em comparação com a técnica de fermentação em tubos múltiplos. Orientadora Maria da penha Longo Mortatti Catanozi. 2005. 104f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, 2005.

HAMON, M.; HÉLÈNE, B.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 423–434, Jun. 2006.

HOFER, E.; NASCIMENTO, R. S. do; OLIVEIRA, M. A. de. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 31, n. 2, p. 173-177, Abr. 1998. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86821998000200002&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821998000200002&lng=en&nrm=iso). Acesso em:

IVANEK, R. Y. T; GROHN, L. W.; TAUER, M. ET AL. The cost and benefit of *Listeria monocytogenes* food safety measures. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 44, p. 513–523, 2004.

JANZTEN, M. M. et al. Review. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR. **Spanish Journal of**



**Agricultural Research**, [S.l.], v. 4, n. 3, p. 235- 237, 2006. Disponível em: <http://revistas.inia.es/index.php/sjar/article/view/198>. Acesso em: 04 ago. 2019. doi:<http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2006043-198>.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J; GOLDEN, D. **Modern Food Microbiology**. 7. ed. New York: Springer, p. 854, 2005.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

PAINTER, J. A; HOEKSTRA, R. M.; AYERS, T.; et al., Attribution of Foodborne Illnesses, Hospitalizations, and Deaths to Food Commodities by using Outbreak Data, United States, 1998–2008. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 19, n. 3, p. 407–415, 2013. Disponível em: [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/3/11-1866\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/3/11-1866_article). Acesso em: 20 ago. 2019.

KIM D.; CHON J.; KIM H. et al. Comparison of culture, conventional and real-time PCR methods for *Listeria monocytogenes* in foods. **Korean Society for Food Science of Animal Resources**, Korea, v. 34, n. 5, p. 665-673, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26761501>. Acesso em: 20 ago. 2019. Epub 2014 Oct 31.

KOCH J; DWORAK, R.; PRAGER, R. et al. Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006-2007. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 12, p. 1581–1584, Dez. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20807110>. Acesso em:

LI, R.; DU, W.; YANG, J. et al. Control of *Listeria monocytogenes* biofilm by paenibacterin, a natural antimicrobial lipopeptide. **Food Control**, v. 84, p. 529–535, 2018.

LINNAN, M. J; MASCOLA, L.; LOU, X. D. et al. Epidemic Listeriosis Associated with Mexican-Style Cheese. **N Engl J Med**, v. 319, n. 13, p. 823–828, 1988.

LUNDÉN, J. M.; AUTIO, T. J.; KORKEALA, H. J. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. **J Food Prot**, Finland. v. 65, n. 7, p. 1129–1133, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12117246>. Acesso em:

MAGALHAES, R.; ALMEIDA, G.; FERREIRA, V. et al. Cheese-related listeriosis outbreak, Portugal, March 2009 to February 2012. **Eurosurveillance**, Portugal, v. 20, n. 17, p. 1–6, 2015. Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V20N17/art21104.pdf>. Acesso em:

MALORNY, B.; TASSIOS, P.; RÅDSTRÖM, P. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **Int J Food Microbiol**, Berlin. v. 25, n. 83, p. 39–48, 2003.

MARTINEZ-RIOS, V.; DALGAARD, P. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in European cheeses: A systematic review and meta-analysis. Copenhagen, Abstract from Nordic Dairy Congress, 2018. Disponível em: [https://orbit.dtu.dk/en/publications/prevalence-of-listeria-monocytogenes-in-european-cheeses-a-systematic-review-and-metaanalysis\(a293e2cb-b4a6-4d7a-b67a-8b4d47a22f12\).html](https://orbit.dtu.dk/en/publications/prevalence-of-listeria-monocytogenes-in-european-cheeses-a-systematic-review-and-metaanalysis(a293e2cb-b4a6-4d7a-b67a-8b4d47a22f12).html). Acesso em; 20 ago. 2019.

MATA, G. M. S. C. Comparação de métodos para pesquisa de *Salmonella sp.* e *Listeria sp.* e avaliação microbiana e físico-química em queijo Minas artesanal. 2009. 89f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/5310>. Acesso em: 20 ago. 2019.

MCLAUCHLIN, J.; REES, C. *Listeria Pirie 1940a 383AL*. In: VOS, P et al. (eds) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. v. 3, 2 ed. New York, Springer, 2009.

MONTEIRO, L. R. L. de; MESQUITA, A. J. de; ANDRE, M. C. D. P. B. et al. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from animal products in a city of Northern Brazil. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 8, p. 1443-1448, Ago, 2013. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782013000800016&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782013000800016&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 04 Agos. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782013000800016>.

ORSI, R. H.; WIEDMANN, M. Characteristics and distribution of *Listeria spp.*, including *Listeria* species newly described since 2009. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 100, n. 12, p. 5273–5287, Jun., 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27129530>. Acesso em: 20 ago. 2019.

PERES, N. D.; LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; et al. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR em leite contaminado artificialmente. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 62, n. 4, p. 973-979. Ago. 2010. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352010000400029&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352010000400029&lng=en&nrm=iso). Acesso em:

PINHO, Mauro de Souza Leite. Pesquisa em biologia molecular: como fazer?. **Rev bras. colo-proctol.**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 3, p. 331-336, Sept. 2006. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-98802006000300016&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-98802006000300016&lng=en&nrm=iso).

RAMOS, S. de N. M.; COSTA, C. A. da. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijo artesanal tipo coalho comercializado na cidade de Manaus-AM, Brasil. **Acta Amaz.**, Manaus, v. 33, n. 4, p. 613-618, Dez. 2003. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0044-59672003000400007&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672003000400007&lng=en&nrm=iso). Acesso em:

RIJPENS, N.; HERMAN, L. Comparison of selective and nonselective primary enrichments for the detection of *Listeria monocytogenes* in cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Belgium, v. 94, n. 1, p. 15–22, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15172481>. Acesso em:

SAUDERS, B. D.; WIEDMANN, Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis and food safety**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, Cap. 2, p. 21-53, 2007.

SCHWAB, J. P; EDELWEISS, M. I. A. Identificação imuno-histoquímica de *Listeria monocytogenes* em placentas fixadas em formol e embebidas em parafina. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 7, p. 501-505, Ago. 2003. Disponível em

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-72032003000700006&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032003000700006&lng=en&nrm=iso).

SOLER, A.; PONSELL, C.; PAZ, M. D. The microbiological quality of milk produced in the Balearic Islands. **International Dairy Journal**, Brooklyn, v. 5, n. 1, p. 6974, 1995 Disponível em: <https://scite.ai/reports/the-microbiological-quality-of-milk-MKKIRp>. Acesso em: .

SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology**, fundamentals and frontiers. 2nd ed., Washington D. C.: ASM, 2001. chap. 18, p. 383-409.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P. et al *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clin Microbiol Rev**, [S. l.], v. 14, n 3, p. 584–640, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88991/>. Acesso em: 20 ago. 2019.

WAY, S. S.; THOMPSON, L. J.; LOPES, J. E.; et al. Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and immunity. **Cellular Microbiology**, Seattle, v. 6, n. 3, p. 235–242, Mar. 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14764107>. Acesso em: 20 ago. 2019.

XUAN, X. T.; DING, T.; LI, J.; AHN, J. H.; et al. Estimation of growth parameters of *Listeria monocytogenes* after sublethal heat and slightly acidic electrolyzed water (SAEW) treatment. **Food Control**, v. 71, p. 17–25, Jan. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516303255>. Acesso em: 20 ago. 2019.

ZOTTOLA, E. A. Microbial attachment and biofilm formation: A new problems for the food industry? **Food Technology**, [S. l. ], v. 48, p. 107–114, 1994.

ZOTTOLA, E. A. Adherence to stainless by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 37, p. 145–153, 1997.

## CAPÍTULO 2

### ARTIGO

#### APLICABILIDADE DA BACTERIOLOGIA CONVENCIONAL E BIOLOGIA MOLECULAR PARA PESQUISA DE *Listeria monocytogenes* EM LEITE UAT

Polyana de Faria Cardoso<sup>1</sup>; Fábio Antônio Colombo<sup>2</sup>; Sandra Maria Oliveira Morais Veiga<sup>3</sup>.

**RESUMO:** A *Listeria monocytogenes* geralmente é responsável por provocar a listeriose, que tem como principais manifestações clínicas: infecção inicial semelhante a um resfriado, com febre baixa, cefaleia, calafrios e mal-estar geral, podendo progredir para meningite, meningocéfalite, septicemia, aborto ou parto prematuro. A taxa de mortalidade encontra-se na faixa de 20-30% dos casos diagnosticados. Os grupos mais susceptíveis, considerados grupos de risco, são mulheres grávidas (e seus fetos), crianças, idosos e indivíduos com o sistema imunológico comprometido. No Brasil, a *Resolução RDC ANVISA/MS n.º 12, de 02 de janeiro de 2001* (BRASIL, 2001) estabelece os padrões microbiológicos para produtos alimentícios expostos à venda, sendo que o micro-organismo *Listeria monocytogenes* deve estar ausente em 25g do alimento. A bacteriologia convencional para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* em alimentos é complexa, envolve duas ou até três formas de enriquecimento das amostras e mesmo assim, muitas vezes, têm-se resultados frustrados. Assim, este projeto teve o objetivo de validar a técnica de biologia molecular tradicional (*Polymerase Chain Reaction - PCR*) para detecção de *Listeria monocytogenes* em leite UAT (Ultra Alta Temperatura) e compará-la com a bacteriologia convencional. Para tanto, 144 amostras de leite estéreis foram artificialmente contaminadas com cepas padrões *Listeria monocytogenes* e analisadas, sob a forma de *pool*, pelas duas metodologias. Além disso, foram preparados controles positivos e negativos. O experimento teve quatro tempos de repetição e foi conduzido em triplicata. Os resultados obtidos pela metodologia da bacteriologia convencional são mais assertivos quando se quer uma análise qualitativa e quantitativa; enquanto a técnica de biologia molecular torna-se interessante para a análise qualitativa, detectando a contaminação pelo micro-organismo, mesmo em pequenas quantidades. Em seguida, verificou-se a aplicabilidade das duas técnicas propostas e adicionou-se a metodologia *PCR Real Time* para a pesquisa do micro-organismo estudado em 90 amostras de leite UAT, de 10 diferentes marcas, oriundas do comércio regional. O experimento teve três tempos de repetição e foi conduzido em triplicata. Ao analisar as amostras, sob a forma de 10 *pool*, apenas a metodologia *PCR Real Time* conseguiu detectar *L. monocytogenes* em uma das marcas analisadas. Assim, a biologia molecular se torna interessante para a indústria, tanto para a liberação de lotes quanto para a avaliação de higienização em linha de produção.

**Palavras-chave:** *Listeria*; Leite UAT; Microbiologia; Biologia Molecular.

**ABSTRACT:** *Listeria monocytogenes* is usually responsible for causing listeriosis, which has the following clinical manifestations: initial infection similar to a cold, with a low fever, headache, chills and general malaise, and may progress to meningitis, meningocephalitis, septicemia, abortion or parturition premature. The mortality rate is in the range of 20-30% of diagnosed cases. The most susceptible groups, considered at-risk groups, are pregnant women (and their fetuses), children, the elderly, and individuals with compromised immune systems. In Brazil, Resolution RDC ANVISA / MS No. 12, of January 2, 2001 (BRAZIL, 2001) establishes the microbiological standards for food products exposed to the sale, and the microorganism *Listeria monocytogenes* should be absent in 25g of the food. Conventional bacteriology for the detection of *Listeria monocytogenes* in food is complex, involves two or even three forms of enrichment of the samples and even then, many times, frustrated results have been obtained. The aim of this project was to validate the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique for the detection of *Listeria monocytogenes* in Ultra High Temperature (UHT) milk and to compare it with conventional bacteriology. For this, 144 samples of sterile milk were artificially contaminated with standard strains *Listeria monocytogenes* and analyzed as a pool by the two methodologies. In addition, positive and negative controls were prepared. The experiment had four replicate times and was conducted in triplicate. The results obtained by the methodology of conventional bacteriology are more assertive when a qualitative and quantitative analysis is required; the technique of molecular biology becomes interesting for the qualitative analysis, detecting the contamination by the microorganisms, even in small amounts. Then, the applicability of the two proposed techniques was verified and the Real Time PCR methodology was used to investigate the microorganism studied in 90 UAT milk samples from 10 different brands from the regional trade. The experiment has three replicate times and was conducted in triplicate. When analyzing the samples as a pool, only the Real Time PCR methodology was able to detect *L. monocytogenes* in one of the analyzed brands. Thus, molecular biology becomes interesting for the industry, both for the batch release and for the hygiene evaluation in the production line.

**Keywords:** *Listeria*; Milk UHT; Microbiology; Molecular biology.

## 1 INTRODUÇÃO

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria em forma de bacilo curto (0,4µm a 0,5µm de diâmetro e 0,5µm a 2µm de comprimento), Gram positivo, não esporulado presente em alimentos, causador da doença denominada listeriose. Apesar de pouco incidente, é responsável por graves complicações como meningite, septicemia e casos de aborto, apresentando um alto índice de mortalidade na população de risco, que inclui gestantes, recém-nascidos, idosos e imunodeficientes ou imunossuprimidos. Desde a década de 1980, quando a doença também foi relatada em humanos, vários estudos vêm demonstrando sua presença no leite e derivados, inclusive no leite pasteurizado e subprodutos. O micro-organismo apresenta crescimento em uma ampla faixa de temperatura (1°C – 45°C) e pH (4.3 – 9.6) e tolera concentrações salinas elevadas ( $\geq 10\%$ ), são móveis a temperatura de 25°C (FRANCO; LANDGRAF, 2008; JAY,

2005). Atualmente, são conhecidas seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* e *L. ivanovii*. Sendo que entre as seis espécies conhecidas, somente a *L. monocytogenes* é considerada patogênica para seres humanos. A listeriose é uma doença caracterizada por um conjunto de fatores causados pela bactéria *Listeria monocytogenes* como a septicemia, meningite, encefalite e infecção cervical ou intra-uterina. Normalmente, não é diagnosticada devido à característica de ser assintomática, sendo então, subnotificada (FRANCO; LANDGRAF, 2008; JAY, 2005). O principal reservatório deste micro-organismo é o solo, lodo, forragem e água, estando associada à queijos, leite, carnes, peixes, frutos do mar, entre outros; o que justifica o principal modo de transmissão, a ingestão de leite contaminado, queijos, água, frutos do mar, legumes crus, dentre outros alimentos, e assim, por esse motivo é considerada uma Doença Transmissível por Alimento (DTA), (FRANCO; LANDGRAF, 2008; JAY, 2005).

A listeriose ficou em evidência na década de 1980, como zoonose transmitida por alimentos, depois de várias ocorrências na América do Norte e na Europa. No entanto, desde 1929 a *L. monocytogene* já era conhecida como agente da listeriose (LINNAN *et al.*, 1988). Principalmente em países industrializados, a ocorrência de listeriose de origem alimentar é relatada, já em países em desenvolvimento, há poucos, ou nenhum relato. Em relação a estes dados, não se pode afirmar que não existem sistemas de pesquisa e informação ou se existem diferentes taxas de exposição, hábitos alimentares e susceptibilidade do hospedeiro ao micro-organismo. No Brasil, as informações sobre Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são bastante escassas. Um estudo realizado no Estado do Paraná, revelou que no ano de 2000 foram gastos pelo governo cerca de 2 milhões de reais, somente em internações devido às DTA. (AMSON, 2006).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) adota a Resolução RDC nº 12 de janeiro de 2001 que estabelece a ausência do patógeno *L. monocytogenes* em 25 g de amostra de alimento (BRASIL, 2011).

O método utilizado para identificação do micro-organismo *L. monocytogenes*, é a cultura, baseada em pré-enriquecimento seletivo, enriquecimento e plaqueamento. Isto é seguido pela caracterização de *Listeria* sp. usando morfologia de colônia, fermentação de açúcar e propriedades hemolíticas. Embora um resultado negativo pelo método microbiológico convencional possa ser confirmado em torno de 4 dias, o tempo para um resultado positivo é geralmente de 5 a 7 dias a partir da coleta da amostra. No entanto, como não é viável para a indústria manter produtos alimentícios por 7 dias antes da distribuição, torna-se necessário o

aprimoramento de métodos mais rápidos para a detecção de *L. monocytogenes* (JANZTEN *et al.*, 2006).

Visando reduzir o tempo de espera e o erro na identificação bacteriana convencional, métodos moleculares estão auxiliando e até mesmo substituindo alguns métodos convencionais, no monitoramento da fabricação de alimentos de origem animal (ANDRADE *et al.*, 2010). Pode-se destacar a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), pela precisão e rapidez. A PCR vem sendo utilizada tanto na identificação de *L. monocytogenes* quanto de diversos outros micro-organismos no controle microbiológico de alimentos (KIM *et al.*, 2014).

A validação entre o método convencional e a técnica de PCR, se faz muito necessária, pois toda vez que o micro-organismo é detectado pela biologia molecular, o resultado deve ser confirmado pela metodologia convencional para atender as exigências do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2016).

A finalidade deste estudo, foi estudar principalmente a metodologia microbiológica convencional e a biologia molecular para detecção e quantificação de *Listeria monocytogenes* em leite UAT (Ultra Alta Temperatura).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado e conduzido nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e de Biologia Molecular da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL – Alfenas – MG, realizando-se análise comparativa entre as metodologias microbiológicas oficiais para a detecção de *Listeria monocytogenes* e a Biologia Molecular.

Foram empregadas três cepas padrão de *L. monocytogenes* (CLIST 2035 Sv.: 1/2a, CLIST 2037 Sv.: 4a, CLIST 2045 Sv.:4b), todas cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Foram contaminadas artificialmente 144 amostras de leite Ultra Alta temperatura (UAT), todos da mesma marca, com três cepas padrões do micro-organismo *Listeria monocytogenes* (Cepas: CLIST 2035 Sv.: 1/2a, CLIST 2037 Sv.: 4a, CLIST 2045 Sv.:4b). Para cada etapa do experimento, foram empregadas 36 amostras, analisadas sob a forma de 9 pool, sendo três pools de cada cepa utilizada. Além dos pools, suspensões das três cepas (controle

positivo) e o leite sem contaminação artificial (controle negativo) foram analisados em triplicata nos quatro tempos de repetição.

O experimento tanto pela Bacteriologia Convencional e Biologia Molecular foram realizados do mesmo modo, com a única diferença que pela Bacteriologia Convencional realizou-se a fortificação.

Posteriormente, foram analisadas 90 amostras de Leite UAT, de 10 diferentes marcas, adquiridas no comércio regional do Sul de Minas Gerais, para verificar a aplicabilidade das metodologias: Bacteriologia Convencional, PCR tradicional (Polymerase Chain Reaction – PCR) e PCR em tempo real (Real Time).

Pela metodologia microbiológica oficial, as amostras sofreram enriquecimento primário e secundário. Para o enriquecimento primário foram utilizados 25 ml das amostras de leite contaminadas para 225 ml de Caldo LEB (*Listeria Enrichment Broth*); na sequência, o conjunto foi homogeneizado e incubado a 30<sup>0</sup>C por 24 h, para o enriquecimento primário. Após esse período, foi realizado o plaqueamento em superfície, nos meios Ágar Oxford (OXA) e Ágar PALCAM, que foram incubados em microanaerobiose a 35<sup>0</sup>C por 24-48h. As colônias suspeitas foram submetidas a testes bioquímicos (SILVA *et al.*, 2010).

Após o período de incubação do enriquecimento primário, foi realizado o enriquecimento secundário, transferindo 1 ml do mesmo, para o caldo Fraser, que foi incubado a 30<sup>0</sup>C por 24-48h e posteriormente, repicado para o OXA e PALCAM; na sequência, realizaram-se as provas bioquímicas.

A Identificação bioquímica das colônias suspeitas de *Listeria monocytogenes* foi feita a partir do crescimento em Caldo Triptosado, 37<sup>0</sup>C/24h.

a) Teste de catalase – transferiu-se uma alçada da cultura anterior para uma lâmina de microscopia e adicionou-se uma gota de peróxido de hidrogênio 3%, observando-se a ocorrência de borbulhamento imediato (teste positivo para *Listeria*) ou não-borbulhamento (teste negativo).

b) Teste de Motilidade – cada cultura suspeita foi inoculada em um tubo de Ágar Sulfeto Indol Motilidade (SIM), por picada, no centro do meio de cultura, até uma distância a 1cm do fundo. Estes tubos foram incubados a 35<sup>0</sup>C/ 5 dias, sendo observados diariamente. As cepas de *Listeria* são móveis e desenvolvem uma zona de migração típica, espalhando-se na parte superior do meio e mantendo-se restritas à picada no fundo do tubo. Esse tipo de migração produz uma massa de crescimento característica, lembrando um guarda-chuva.



c) Reação de Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) – cada cultura foi repicada para um tubo de Ágar TSI, por picada em profundidade e estrias na rampa. Os tubos foram incubados a 35°C/24h com a tampa ligeiramente afrouxada, para manter condições aeróbias. Neste meio, a presença e multiplicação de *Listeria* sp é indicada pela alteração de cor, do vermelho para o amarelo. A rampa e a base ficam ácidas - amarelas (fermentam sacarose, lactose e glicose).

d) Teste de verificação de hemólise – em uma placa de Ágar Sangue Base suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, estriou-se a cultura obtida em Caldo Triptosado. A placa foi incubada a 35°C/48h. Observou-se a formação de um halo transparente de hemólise ao redor das colônias. As cepas de *L. monocytogenes* formam halos de hemólise discretos, que não se estendem muito além da região da colônia, enquanto *L. ivanovii* forma halos grandes e bem definidos e *L. innocua* não apresenta hemólise.

e) Teste de CAMP - uma cultura hemolítica de *S. aureus* (ATCC 49444, ATCC 25923, NCTC 7428 ou CIP 5710) e uma cultura de *Rhodococcus equii* (ATCC 6939 ou NCTC 1612) foram inoculadas em uma placa de Ágar Sangue previamente preparada. Inoculou-se a cultura suspeita perpendicularmente, em uma única estria, no espaço entre as estrias de *S. aureus* e *R. equii*. Esta placa foi incubada a 35°C/24-48h e observou-se a ocorrência de halo transparente de hemólise ao redor das estrias inoculadas. As cepas de *L. monocytogenes* produziram uma reação de hemólise discreta, porém, nas proximidades da estria de *S. aureus*, o halo torna-se maior e mais nítido. As cepas de *L. ivanovii*, ao contrário, apresentam halo mais nítido nas proximidades da estria de *R. equii*. *L. seeligeri* apresenta reação semelhante à de *L. monocytogenes*. As outras espécies de *Listeria* não são hemolíticas e não reagem nesse teste.

f) Teste de fermentação da xilose, raminose, manitol, glicose – inoculou-se uma alçada de cada cultura do Caldo Triptosado em tubos, contendo caldo Púrpura Base suplementado com 0,5% do carboidrato a ser testado. Os tubos contendo glicose e manitol foram incubados por 24-48 horas e os outros por até 7 dias, à temperatura de 35°C. Realizaram-se observações diárias da produção de ácido (demonstradas pela alteração da cor do meio, de púrpura para amarelo) e produção de gás (coletado em tubos de Durham). Nenhuma cepa de *Listeria* produz gás a partir desses compostos de carbono e todas fermentam a glicose. *L. monocytogenes* também fermenta a raminose, mas não fermenta a xilose e o manitol.

A metodologia da biologia molecular tradicional (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) foi realizada em duas etapas: extração e identificação, conforme proposto por Bansal (1996) e Nayak *et al.*, (2015).

Foram coletadas amostras de 1 ml de leite integral contaminado com *Listeria monocytogenes* para a extração de material genético, bem como de todos os controles positivos e negativos.

Todas as amostras e controles foram processadas e os materiais genéticos extraídos pelo *Purelink Genomic DNA kit* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas no Nanodrop ND2000 (Thermo Scientific) e estocadas a -20°C.

Para o PCR convencional e escolha dos iniciadores, as amplificações foram realizadas, utilizando um kit comercial (GoTaq®Green Master Mix ou DreamTaq PCR Master Mix) contendo 2 corantes (azul e amarelo) que permitem monitorar o progresso das amostras e controles durante a eletroforese. Cada 12,5 ml do “mix” contém 1 unidade de Taq DNA polimerase em 10mM Tris-HCl, pH 8.5; 50mM KCl; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> e 200 mM de cada um dos desoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Cada reação foi realizada adicionando-se 5µl do DNA alvo e 50 pmol de cada marcador molecular em um volume final de 25µl. A detecção do DNA específico de *Listeria monocytogenes* foi realizada pela PCR tradicional com a utilização do par de iniciadores LF (CAA ACG TTA ACA ACG CAG TA) e LR (TCC AGA GTG ATC GAT GTT AA), desenhados a partir da sequência do gene da Listeriolisina O, que amplificam uma sequência de 750 pares de bases (BANSAL, 1996). As amplificações foram realizadas utilizando um termociclador ABI StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems) e consistem em um ciclo inicial de desnaturação de 2 minutos a 95°C e uma segunda etapa com 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos; anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Após estas etapas, o processo é finalizado por um ciclo final de extensão de 10 minutos a 72° C.

Foram adotadas medidas de controle em todas as etapas da reação. Para cada conjunto de reações, foram adicionados dois controles negativos, um contendo apenas água destilada e outro com DNA extraído de amostra sabidamente negativa para *Listeria monocytogenes*; e um controle positivo, extraído a partir de cultura.

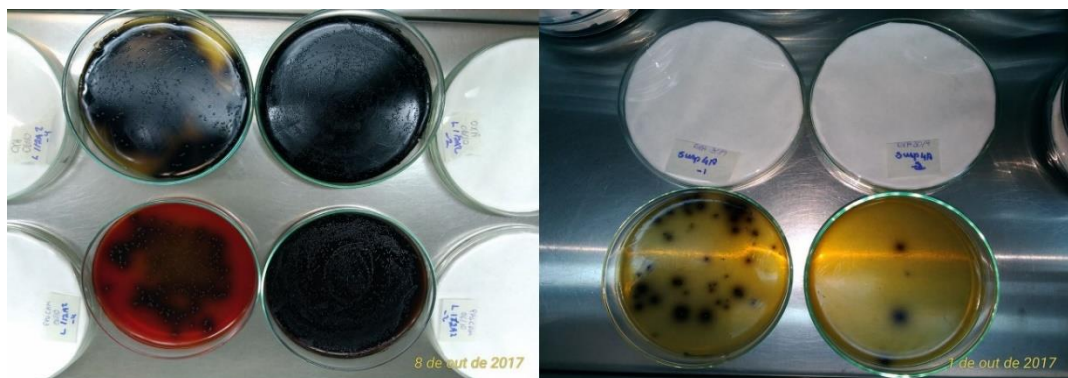
Para a eletroforese em gel de agarose, os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 2% em TBE (0,045M de Tris-Borato; 0,001M EDTA) com 0,05 µl/ml de brometo de etídio e separados por um sistema de eletroforese horizontal numa cuba contendo o mesmo tampão. Os géis foram visualizados, e as imagens adquiridas em um sistema de aquisição de imagens (Gel Image and Documentation (BioSystematica)). O tamanho dos fragmentos foi comparado com um padrão de 100 pares de base.

Os dados obtidos foram analisados a partir do teste de independência Qui-Quadrado, para comparação se existe associação entre as respostas e o gênero dos participantes da pesquisa. Para isso, foram montadas tabelas de contingência com perguntas para avaliar se houve associação entre as respostas, por exemplo, se os métodos detectavam de maneira semelhante a presença/ausência da bactéria e também se acertavam/erravam o resultado, por meio do teste estatístico acima citado, fundamentado na comparação das frequências absolutas observadas com as frequências absolutas que se teriam no caso de independência entre as variáveis.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

É possível observar na Figura 1, o crescimento de colônias pretas sugestivas de *Listeria monocytogenes* nos meios de cultura OXA e PALCAM oriundas de amostras de leite artificialmente contaminadas com cepas padrões. Com os contaminantes presentes nos cultivos, foi possível a identificação bioquímica das colônias suspeitas de *Listeria monocytogenes* pela bacteriologia convencional.

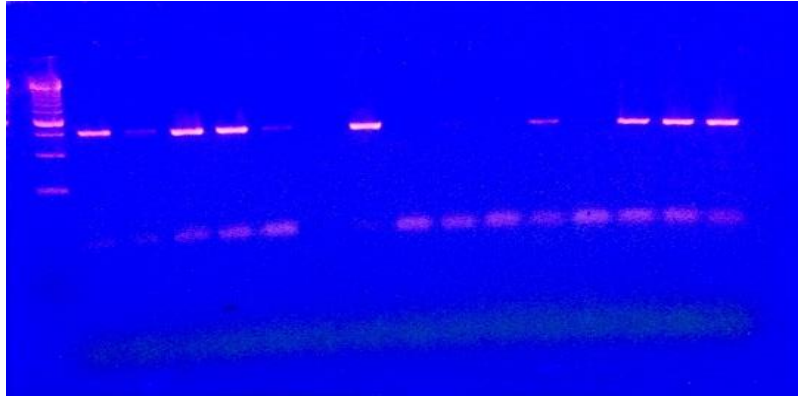
Figura 1 - Colônias pretas sugestivas de *Listeria monocytogenes* nos meios de cultura OXA e PALCAM oriundas de amostras de leite, artificialmente contaminadas



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Na Figura 2, observa-se os diferentes fatores de virulência detectados, utilizando a PCR convencional. Este tipo de resultado, de grande relevância na esfera da infectologia, permite avaliar no segmento de DNA pesquisado, uma sequência gênica presente exclusivamente em um determinado ser vivo de outra espécie, seja este um vírus ou bactéria, denotando assim, a sua presença anômala.

Figura 2 - Gel de agarose contendo amostras de DNA amplificado de *L. monocytogenes* oriundas de leite contaminado artificialmente para reação de PCR específico para *Listeria monocytogenes*



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

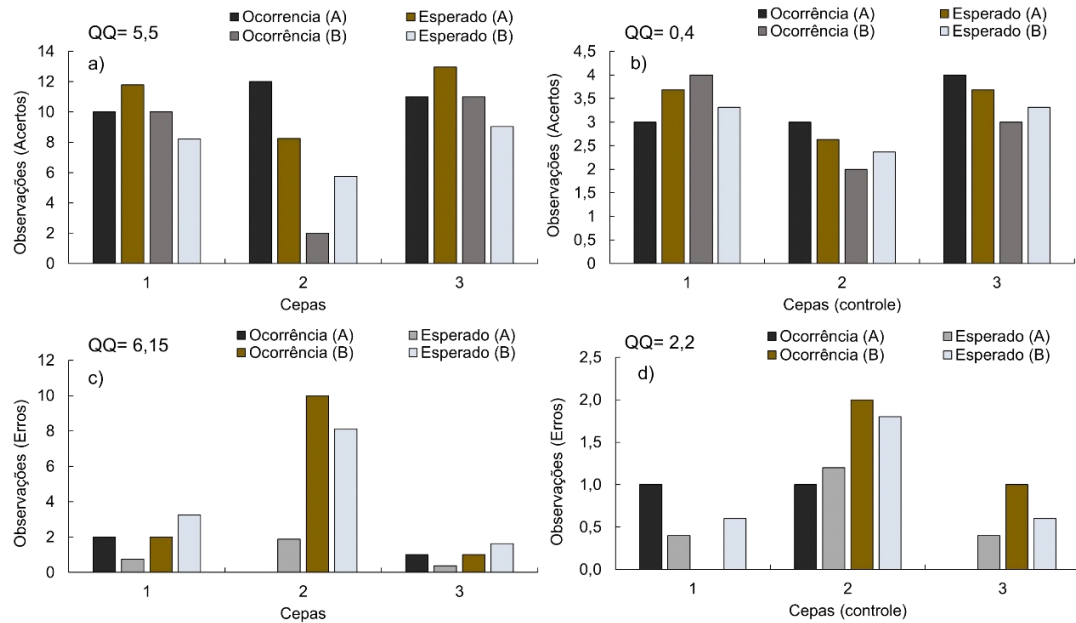
A análise comparativa entre a bacteriologia convencional (a) e biologia molecular PCR tradicional (b), pode ser observada na Figura 3. Avaliando a diferença entre os métodos (FIGURA 3a), constata-se que era esperado para bacteriologia convencional na cepa um, doze acertos, no entanto, obteve-se a ocorrência de apenas 10 acertos. A mesma observação pode ser feita para cepa 2 e 3, entre a biologia molecular (PCR) e bacteriologia convencional, respectivamente. Logo, os métodos acertaram menos do que o esperado.

O teste de hipóteses de Qui Quadrado (QQ) que se destina a encontrar um valor da dispersão para duas variáveis nominais, avaliando a associação existente entre variáveis qualitativas, obteve valor de 5,5 (Figura 3.a). Sabe-se que o valor 3,841 delimita 5% do teste. Este é o valor crítico de Qui Quadrado, que aceita a hipótese nula, não ocorrendo associação entre os grupos, ou, a hipótese alternativa, ocorrendo associação entre os grupos.

É importante ressaltar que, quando as frequências observadas são muito próximas às esperadas, o valor de QQ é pequeno, menor que 3,841. Mas, quando as divergências são grandes entre a frequência observada e esperada, conseqüentemente QQ assume valores altos, acima de 3,841, rejeitando a hipótese de igualdade estatística entre os números observados e esperados, ou seja, admite-se que os desvios são significativos.

Na Figura 3b e 3d, os valores de QQ foram de 0,4 e 2,2. Esses valores denotam hipótese de igualdade estatística entre os números observados e esperados, admite-se que os desvios não são significativos, não ocorrendo associação entre os grupos observados.

Figura 3 - Análise comparativa entre as metodologias bacteriologia convencional (A) e a Biologia Molecular PCR Tradicional (B), para ausência (acerto) e presença (erro) de *Listeria monocytogenes* e estimativa do Qui Quadrado (QQ), para as diferentes interações

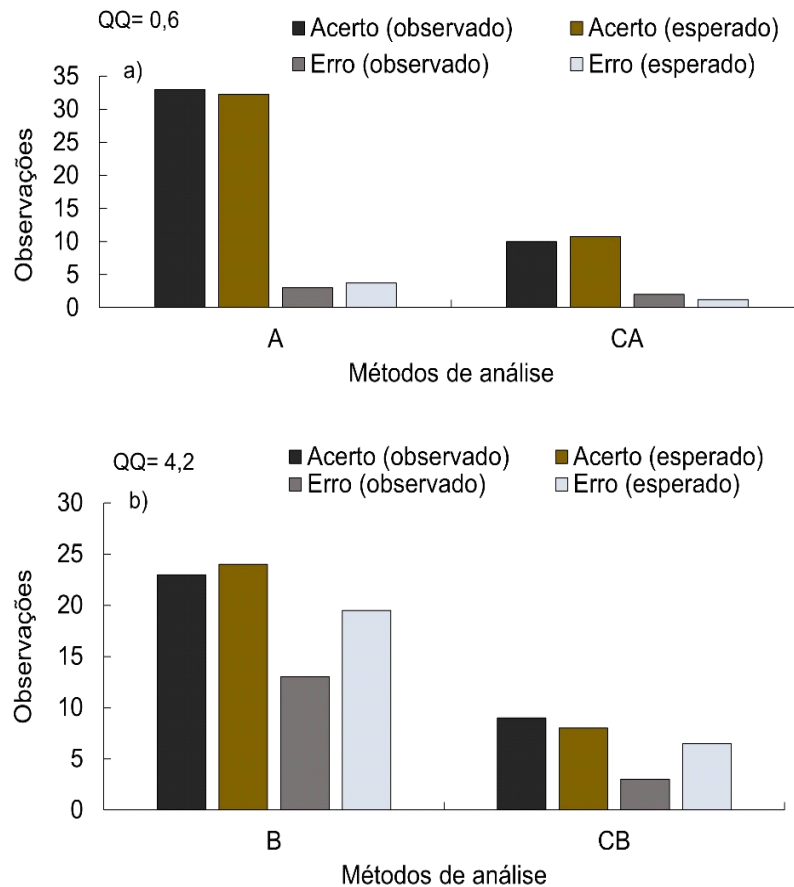


Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Para as interações entre bacteriologia convencional (A) e controle de cepas para bacteriologia convencional (CA), obteve-se menores acertos e maiores erros. Os resultados esperados eram de 32 acertos para A e 11 para CA, sendo observados 33 e 10 acertos respectivamente (FIGURA 4a). Os erros esperados para CA era de 1, observando-se 2 erros e para A, eram de 4 esperado com 2 observados. O QQ de 0,6 entre as interações denotam que não ocorre associação entre os grupos avaliados.

Entre a biologia molecular PCR (B) e controle das cepas para biologia molecular PRC (CB), foram observadas a mesma interação com menores acertos e maiores erros, no entanto, o QQ dessa interação foi de 4,2, indicando que há associação e ocorre desvios entre os grupos (FIGURA 4b).

Figura 4 - Análise comparativa entre as metodologias microbiológicas convencionais (A) e controle de cepas para bacteriologia convencional (CA) (a) e biologia molecular PCR (B) e controle das cepas para biologia molecular PRC (CB) (b), para ausência (acerto) e p presença (erro) de *Listeria monocytogenes* e estimativa do Qui Quadrado (QQ), para as diferentes interações.



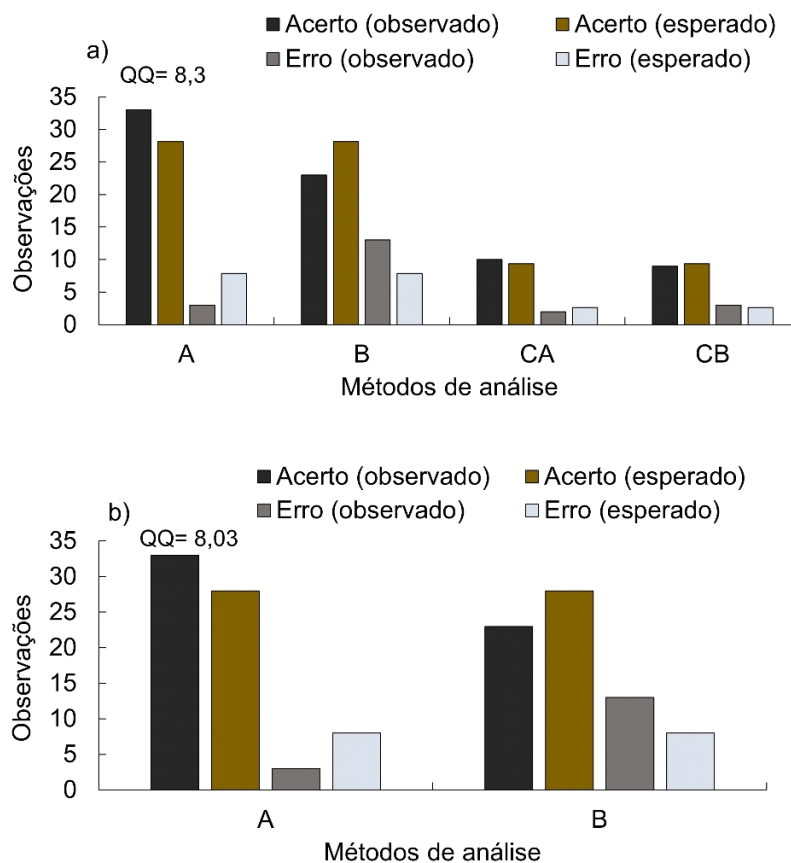
Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Nas análises comparativas entre todos os métodos, observou-se que ocorreu associação entre os grupos, existindo diferenças significativas entre as frequências, e por conseguinte, desvios significativos entre elas, com QQ de 8,3. Houve três erros para A e eram esperados 8, assim como para o controle, o número observado foi menor que o esperado (FIGURA 5a).

Para B, o número observado também foi menor que o esperado. No entanto, o método controle apresentou o observado igual ao esperado (FIGURA 5).

Entre as análises comparativas de A com B, ocorreram divergências entre as frequências esperadas e observadas, com QQ de 8,03 (FIGURA 5b). Logo, ocorre associação entre os grupos de microbiologia convencional e molecular (PCR). Ao se comparar tanto A como B, observa-se que os dois acertam mais que o esperado, contudo, B errou mais que A.

Figura 5 -Análise comparativa entre as metodologias microbiológicas convencionais (A), biologia molecular PCR (B), controle de cepas para bacteriologia convencional (CA) e controle das cepas para biologia molecular PCR (b) (a). Análise comparativa entre as metodologias microbiológicas convencionais (A), biologia molecular PCR (B) (b), para ausência (acerto) e presença (erro) de *Listeria monocytogenes* e estimativa do Qui Quadrado (QQ), para as diferentes interações.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

A literatura mostra que estudos comparando métodos convencionais e de PCR com métodos bacteriológicos padrão, nem sempre foram concordantes (ALMEIDA *et al.*, 2013). Relatando que a PCR apresenta uma sensibilidade igual ou maior que métodos de culturas tradicionais.

Peres *et al.* (2010) avaliaram a técnica de PCR como opção para reduzir o tempo de detecção de *L. monocytogenes* no leite, comparando os resultados da reação de PCR com os da cultura da amostra empregando-se a metodologia padronizada tradicional. A técnica de PCR não foi eficiente para a detecção de *L. monocytogenes* diretamente do caldo de enriquecimento

listeria (LEB). Entretanto, foi eficiente para a identificação da bactéria a partir das colônias suspeitas em meio seletivo (Oxford e Palcam), possibilitando sua identificação definitiva em apenas algumas horas.

Peres *et al.*, (2010) não detectaram *L. monocytogenes* pela reação de PCR quando realizada a partir do caldo LEB após 24 horas de incubação oriunda de amostras de leite cru integral ou leite desnatado pasteurizado. No entanto, após 48 horas de enriquecimento no mesmo caldo, foi possível identificar a bactéria por PCR nas amostras oriundas de leite desnatado, mas não naquelas provenientes de amostras de leite cru integral. Os melhores resultados obtidos por Peres *et al.*, (2010) foram quando a reação foi realizada com material obtido diretamente da colônia suspeita em meio sólido, indicando que é possível substituir os testes fenotípicos de identificação de *L. monocytogenes* pela técnica de PCR, reduzindo-se então, o tempo de identificação da bactéria.

Gonçalves *et al.*, (2014), avaliando o limite de detecção da técnica de PCR para *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp verificaram que a técnica de PCR mostrou possuir uma boa sensibilidade para a detecção de *Salmonella* spp e *L. monocytogenes*.

Shalaby *et al.*, (2011) estudaram 66 amostras clínicas e 100 amostras de alimentos, comparando o método microbiológico convencional de diagnóstico com a PCR para detecção de *L. monocytogenes*. Verificaram que um total de 7,6% dos isolados de *L. monocytogenes* foram identificados, tanto pelo método convencional e PCR, em diferentes amostras clínicas. No entanto, a PCR identificou 6% de *L. monocytogenes* isoladas de produtos alimentares e apenas 4% dos isolados foram identificados pelo método convencional, concluindo que a PCR é um procedimento rápido, com alta sensibilidade e especificidade, para a detecção e identificação de *L. monocytogenes* a partir de amostras clínicas e de alimentos.

Nas análises dos leites UAT comerciais, observou-se que para as técnicas de Bacteriologia convencional, PCR tradicional e PCR em tempo real, que os três métodos foram eficientes, nas análises dos controles positivos e negativos (TABELA 1).

Tabela 1 - Análise e comparação entre as metodologias microbiológicas convencionais, biologia molecular PCR tradicional e biologia molecular PCR *RealTime*.

	Bacteriologia Convencional			PCR Tradicional			PCR RealTime		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Controle Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle Positivo Cepa 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle Positivo Cepa 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle Positivo Cepa 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.



Nas análises dos leites UATs comerciais, observou-se que nos *pools* das 10 amostras, não houve detecção da bactéria *Listeria monocytogenes* na técnica de Bacteriologia convencional e PCR tradicional. Já na técnica de PCR em tempo real, o micro-organismo foi detectado em uma das 10 amostras analisadas (TABELA 2).

Tabela 2 - Análise e comparação entre as metodologias microbiológicas convencionais, biologia molecular PCR tradicional e biologia molecular PCR *RealTime*. Mostra que somente na biologia molecular PCR *RealTime*, houve a detecção do micro-organismo, *Listeria monocytogenes*, nas amostras analisadas.

	Bacteriologia Convencional			PCR Tradicional			PCR RealTime		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Pool Amostra 1 - 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 1 - 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 1 - 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 2 - 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 2 - 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 2 - 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 3 - 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 3 - 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 3 - 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 4 - 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 4 - 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 4 - 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 5 - 1	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Pool Amostra 5 - 2	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Pool Amostra 5 - 3	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Pool Amostra 6 - 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 6 - 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 6 - 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 7 - 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 7 - 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 7 - 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 8 - 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 8 - 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 8 - 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 9 - 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 9 - 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 9 - 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 10 - 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 10 - 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool Amostra 10 - 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Analisando as metodologias utilizadas, observou-se que, tanto nas técnicas bacteriologia convencional quanto na biologia molecular PCR tradicional, não houve detecção do micro-organismo. Já na técnica de biologia molecular PCR *Real Time*, ocorreu a detecção de *Listeria monocytogenes* em uma das marcas analisadas. Nas análises dos controles positivos e negativos, observou-se que houve acerto de 100% nos três métodos utilizados na pesquisa.

A literatura mostra que, estudos comparando métodos convencionais e de PCR com métodos bacteriológicos padrão, nem sempre foram concordantes (ALMEIDA *et al.*, 2013). Relatando que a PCR apresenta uma sensibilidade igual ou maior que métodos de culturas tradicionais.

Peres *et al.*, (2010), avaliaram a técnica de PCR como opção para reduzir o tempo de detecção de *L. monocytogenes* no leite, comparando os resultados da reação de PCR com os da cultura da amostra, empregando-se metodologia padronizada tradicional. A técnica de PCR não foi eficiente para a detecção de *L. monocytogenes* diretamente do caldo de enriquecimento *listeria* (LEB). Entretanto, foi eficiente para a identificação da bactéria suspeita em meio seletivo (Oxford e Palcam), possibilitando sua identificação definitiva em apenas algumas horas.

Peres *et al.*, (2010) não detectaram *L. monocytogenes* pela reação de PCR quando realizada a partir do caldo LEB após 24 horas de incubação, em amostras de leite cru integral ou leite desnatado pasteurizado. No entanto, após 48 horas de enriquecimento no mesmo caldo, foi possível identificar a bactéria por PCR nas amostras de leite desnatado, mas não nas amostras de leite cru integral. Os melhores resultados obtidos por Peres *et al.* (2010) foram quando a reação foi realizada com material obtido diretamente da colônia suspeita em meio sólido, indicando que é possível substituir os testes fenotípicos de identificação de *L. monocytogenes* pela técnica de PCR reduzindo-se o tempo de identificação da bactéria.

Gonçalves *et al.*, (2014), avaliando o limite de detecção da técnica de PCR, para *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp, demonstraram que a técnica de PCR mostrou possuir uma boa sensibilidade para a detecção de *Salmonella* spp e *L. monocytogenes*.

Shalaby *et al.*, (2011) estudaram 66 amostras clínicas e 100 amostras de alimentos, comparando o método microbiológico convencional de diagnóstico com a PCR para detecção de *L. monocytogenes*. Verificaram que um total de 7,6% dos isolados de *L. monocytogenes* foram identificados tanto pelo método convencional e PCR, em diferentes amostras clínicas. No entanto, a PCR identificou 6% de *L. monocytogenes* isoladas de produtos alimentares e apenas 4% dos isolados foram identificados pelo método convencional, concluindo que a PCR

é um procedimento rápido, com alta sensibilidade e especificidade, para a detecção e identificação de *L. monocytogenes* a partir de amostras clínicas e de alimentos.

#### 4 CONCLUSÃO

Após a realização e finalização do primeiro experimento, observou-se que apesar da obtenção de resultados mais rápidos, a Biologia Molecular tradicional, acerta menos que a Bacteriologia Convencional, comprovando que a Bacteriologia Convencional ainda é a metodologia mais assertiva para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* em alimentos.

No segundo experimento, observou-se que apesar das três técnicas acertarem 100% das análises controle, quando a pesquisa foi realizada em amostras oriundas de leite UAT com microbiota natural, somente a metodologia da Biologia Molecular PCR *Real Time* conseguiu detectar a presença do micro-organismo pesquisado em uma das amostras analisadas.

Os resultados obtidos, mostram a necessidade de pesquisas futuras para que novas técnicas de PCR sejam testadas e aprimoradas para análise de *Listeria monocytogenes* em alimentos.

Resultados mais rápidos em relação a Bacteriologia Convencional são observados nos métodos fundamentados em PCR.

Com a detecção do DNA do micro-organismo pesquisado se faz necessária a bacteriologia convencional, pois a PCR detecta DNA, mas não distingue se a bactéria está viável ou não.

O PCR *Real Time* mostrou-se mais sensível e rápido para a detecção do micro-organismo em relação ao PCR tradicional.

A biologia molecular PCR *Real Time* se torna interessante para a indústria de alimentos, tanto para a liberação de lotes quanto para a avaliação de higienização em linha de produção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C. et al. Detection of *Salmonella* entérica serovar Enteritidis using real time PCR, immuno capture assay, PNA FISH and standard culture methods in different types of food samples. **International Journal of Food Microbiology**, Braga, v. 161, n. 1, p. 16-22, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23246608>. Acesso em: 09 ago. 2019.
- AMSON, G. V. et al. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná - Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciencê. Agrotec.**, v.30, n.6, p.1139-1145, 2006.
- ANDRADE, R; GEMELLI, T; ONDER, L. P. D. et al. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.4, p.741-750, out./dez., 2010. Disponível em: [www.biologico.sp.gov.br > uploads > docs > arq > v77\\_4 > andrade](http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v77_4/andrade). Acesso em: 09 ago. 2019.
- BANSAL, N. S. Development of a polymerase chain reaction assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **Lett Appl Microbiol.** Australia, v.22, n. 5, p. 353–356, 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8672273>. Acesso em: 04 ago. 2019.
- BRASIL. DOC SAC/CGAL nº 04: Escopo da Área de Microbiologia em Alimentos e Água - Revisão 10. Brasília: Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento, 2016.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.
- GONÇALVES, J. S.; CHEIRUBIM, A. P.; BRITO, K. C. T. de et al. Detecção de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* através de técnica de PCR. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** Umuarama, v. 17, n. 4, p. 223-226, out./dez. 2014.
- JANZTEN, M. M. et al. Review. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR. **Spanish Journal of Agricultural Research**, [S.l.], v. 4, n. 3, p. 235- 237, 2006. Disponível em: <http://revistas.inia.es/index.php/sjar/article/view/198>. Acesso em: 04 ago. 2019. doi:<http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2006043-198>.
- JAY, J. M.; LOESSNER, M. J; GOLDEN, D. **Modern Food Microbiology**. 7. ed. New York: Springer, p. 854, 2005.
- KIM D.; CHON J.; KIM H. et al. Comparison of culture, conventional and real-time PCR methods for *Listeria monocytogenes* in foods. **Korean Society for Food Science of Animal Resources**, Korea, v. 34, n. 5, p. 665-673, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26761501>. Acesso em: 20 ago. 2019. Epub 2014 Oct 31.

LINNAN, M. J; MASCOLA, L.; LOU, X. D. et al. Epidemic Listeriosis Associated with Mexican-Style Cheese. **N Engl J Med**, v. 319, n. 13, p. 823–828, 1988.

NAYAK, D.N., SAVALIA, C. V., KALYANI I.H. et al. Isolation, identification, and characterization of *Listeria* spp. from various animal origin foods. **Vet World**. v. 8, n. 6, p. 695–701, Jun, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27065632>. Acesso em: 4 Ago. 2019.

PERES, N. D. LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; et al. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR em leite contaminado artificialmente. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 62, n. 4, p. 973-979, Ago 2010. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352010000400029&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352010000400029&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 05 Ago. 2019.

SHALABY, M. A; MOHAMED, M. S; MANSOUR, M. A, et al. Comparison of polymerase chain reaction and conventional methods for diagnosis of *Listeria monocytogenes* isolated from different clinical specimens and food stuffs. **Clin. Lab. Egito**, v. 57, n. 11/12, p.. 919-924, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22239022>. Acesso em:

SILVA, N. D.; JUNQUEIRA, V. C. A; SILVEIRA, N. F. A et al. *Listeria monocytogenes*. In: \_\_\_\_\_. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. cap. 18, p. 261-287.