

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial



Tese

Listeria monocytogenes:

detecção de células injuriadas por altas pressões e efeito de pré-enriquecimentos na PCR em Tempo Real

Márcia Monks Jantzen

Pelotas, 2006

Márcia Monks Jantzen

Listeria monocytogenes:

detecção de células injuriadas por altas pressões e efeito de pré-enriquecimentos na PCR em Tempo Real

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Microbiologia de Alimentos)

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Co-orientador: Dr. Joaquín Martínez-Suárez

Pelotas, 2006

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

J31 Jantzen, Márcia Monks

Listeria monocytogenes : detecção de células injuriadas por altas pressões e efeito de pré-enriquecimentos na PCR em tempo real / Márcia Monks Jantzen. - Pelotas, 2006.
183f.

Tese (Doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2006.
Wladimir Padilha da Silva, Orientador; co-orientador Joaquim Martinez-Suárez.

1. Listeria monocytogenes 2. Métodos de detecção 3. ALOA 4. Altas pressões 5. PCR em tempo real I Silva, Wladimir Padilha da (orientador) II .Título.

CDD 664

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi

Profa. Dra. Susana Juliano Kalil

Profa. Dra. Silvana Carro Techera

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva (Orientador)

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará a seu tamanho original”
Albert Einstein

Aos meus pais, irmãos, sobrinho e Cacá

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas, em especial ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, por ter depositado em mim confiança para o desenvolvimento da tese.

À CAPES, pela concessão da bolsa no Brasil.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa *sandwich* na Espanha.

Ao meu orientador Wlamidir Padilha da Silva, por novamente conduzir-me na coordenação de um trabalho de pós-graduação e participar de minha formação profissional e pessoal.

Aos professores e funcionários do DCTA, por me prestarem apoio laboral e aconselhamentos na jornada. Em especial aos professores Cesar Rombaldi e Pedro Antunes pela ajuda na elaboração do projeto de pedido da bolsa-sandwich.

Aos colegas Cláudio, Heloisa, Ana Cristina, Cris e Charli, pelos momentos de descontração no “laboratório do Germano”.

Aos companheiros de laboratório e amigos Ana Eucares, Andréia, Eduarda, Márcia Mata, Fernando Zocche, Márcia Araújo, Elen, Vanessa e Kátia, pela ajuda nos trabalhos e pela amizade.

Ao colega e amigo Eliezer, pelos aconselhamentos profissionais e colega de espanhol nas “clases” da colega, amiga e professora Silvana, que foi uma das alavancas para minha partida para Espanha.

À direção geral e ao diretor do Departamento de *Ciencia y Tecnología de los Alimentos* do Instituto Nacional de *Ciencia y Tecnología Agraria y Alimentaria* (INIA), Dr. Manolo Nuñez, por permitir o desenvolvimento dos trabalhos naquela instituição, proporcionando todo o material e instalação necessários para o projeto. Ao meu co-orientador estrangeiro Joaquín Martínez-Suárez, exemplo de profissional, a quem tenho

grande admiração, por antes mesmo de conhecer-me, abrir as portas de seu laboratório e de seu país para a realização dos experimentos.

Aos pesquisadores e funcionários do INIA: Antonia Picolo, Margarita Medina, Pilar Gaya, Pilar Morales, Estrella, Eva Rodríguez, Sonia, Eva Maria e Javi, pelo auxílio prestado e pela convivência e transmissão da cultura espanhola durante o café. Às *becárias* Marta e Raquel, pelo coleguismo e incentivo.

Aos companheiros de planta de processamento: Buenaventura e Máximo, pelo importante auxílio para o uso do equipamento de altas pressões e para me colocarem em dia com os *chistes* espanhóis.

Aos colegas de laboratório Pylar, Sagrario e Victoria, pelos ensinamentos e ajudas prestadas. Em especial ao colega Jaime, que entre pressurizações e PCR's dividiu momentos difíceis e alegres de pesquisa e me fez compreender as diferenças e semelhanças entre culturas.

À minha colega de apartamento na Espanha, Fabiane, e as amigas Ceni e Cecília, por compartilharem dificuldades lá fora, por me incentivarem a nunca desistir de um ideal, e por dividirem momentos de risos e alegrias.

A minha família, por me apoiar nessa difícil jornada e por me fazer lembrar de que sempre estarão prontos a ajudar-me.

Ao Cacá, pelo incentivo e apoio de meu trabalho e por acreditar e provar que o amor vence todos os obstáculos. A grandiosidade de seus gestos e atos ajudou-me a vencer essa difícil etapa.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus, por permitir-me viver tudo isso.

RESUMO

JANTZEN, Márcia Monks. ***Listeria monocytogenes*: detecção de células injuriadas por altas pressões e efeito de pré-enriquecimentos na PCR em Tempo Real**. 2006. 171f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A identificação de *Listeria monocytogenes* necessita rapidez e precisão devido a importância dessa bactéria em infecções alimentares. Os métodos rápidos baseados na detecção de antígenos são de uso fácil, porém, são poucos aqueles específicos para *L. monocytogenes*. Já os baseados em PCR tornaram-se mais difundidos na indústria de alimentos quando kits comerciais foram desenvolvidos. Novos métodos de detecção, tais como *Microarray* e Biosensores, são alguns exemplos das novas tecnologias lançadas pela nanotecnologia e que poderão ser utilizadas no futuro para detectar-se *L. monocytogenes* nos alimentos. No presente trabalho objetivou-se facilitar a detecção de *L. monocytogenes*, um teste de PCR em Tempo Real, baseado no *SYBR[®] Green I*, utilizando iniciadores para o gene *inlA* foi desenvolvido. Os resultados com cultivos puros e amostras de carne de frango artificialmente contaminadas indicaram que o ensaio de PCR foi um método altamente específico e sensível. Trinta e sete amostras provenientes do comércio foram enriquecidas conforme protocolo estabelecido pela USDA para a detecção de *L. monocytogenes* em carne. A eficácia do teste de PCR foi estudada após as etapas de enriquecimento primário e secundário, e após semeadura em *Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti* (ALOA). Em 75% das amostras detectou-se *L. monocytogenes*, onde os cultivos primários alcançaram taxas de 70% e 37% para o cultivo em placa e para PCR, respectivamente, e nas amostras de enriquecimento secundário as taxas de isolamento foram de 54% e 70%, em placas e em PCR. O tipo de enriquecimento utilizado influenciou a sensibilidade do teste e, provavelmente, está relacionada não somente ao limite de crescimento de *L. monocytogenes* em enriquecimento primário (falso-negativos em PCR), mas também à elevada população de *Listeria* spp. em enriquecimento secundário (falso-negativos em cultivo). O principal desafio da detecção de *L. monocytogenes* por PCR em amostras de alimentos é a baixa capacidade do caldo de cultivo de enriquecimento primário em favorecer o crescimento desse microrganismo. O aprimoramento das condições de enriquecimento pode ajudar a incrementar a sensibilidade da técnica. Um outro desafio bastante pertinente na indústria de alimentos é evitar a presença, no produto, de bactérias injuriadas, porém viáveis. Por essa razão também se objetivou avaliar um método cromogênico quantitativo para o isolamento de *L. monocytogenes* injuriadas subletalmente. A inativação de *L. monocytogenes* EGD-e em pressões acima de 400 MPa e a 12°C em carne de frango foi estudada para verificar o impacto do tratamento por altas pressões na recuperação de bactérias injuriadas. Para isso, as amostras foram semeadas em ALOA, e no mesmo ágar suplementado com 4% de NaCl (ALOA-

S), antes e após diferentes períodos de incubação a 30°C em caldo não-seletivo. As células injuriadas subletalmente foram capazes de crescer quando semeadas diretamente no ágar ALOA, entretanto, não cresceram no ágar ALOA-S. Observou-se que as células de *L. monocytogenes* injuriadas subletalmente por altas pressões podem ser quantificadas pela diferença na contagem entre o ALOA e o ALOA-S. Além disso, contagens superiores a 100 UFC.g⁻¹ de células injuriadas de *L. monocytogenes* podem ser realizadas diretamente em ALOA.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*. Métodos de detecção. ALOA. PCR em Tempo Real. Altas Pressões

ABSTRACT

JANTZEN, Márcia Monks. **Detecção de *Listeria monocytogenes* injuriada por altas pressões e utilização de PCR em Tempo Real para a identificação de baixos números do microrganismo.** 2006. 191f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Listeria monocytogenes identification must be fast and accurate according to its importance as a foodborne pathogen. Rapid methods based on the detection of antigens are easy to be used, therefore there are few of them which are specific for *L. monocytogenes*. Tests based on Polymerase Chain Reaction (PCR) became more divulged in food industry when commercial test kits were developed. Novel detection methods, such as Microarray and Biosensors are some examples of new technologies based on nanotechnology and they may be used in the future to detect *L. monocytogenes* from food. With the aim to facilitate the detection of *L. monocytogenes*, it was developed a Real Time PCR assay based on SYBR[®] Green I and using primers to *inlA* gene. Results with pure cultures and with artificially contaminated chicken meat samples indicated that PCR was high specific and sensitivity. Thirty seven retail samples were enriched according to USDA for the detection of *L. monocytogenes* in meat. Efficacy of PCR was evaluated after primary and secondary enrichment and after be plated onto *Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti* (ALOA). *L. monocytogenes* was detected in 75% of samples, with primary cultures reaching 70% and 37% for plate count agar and for PCR, respectively, and in secondary enrichment samples the isolation ratios was 54% and 70%, respectively. Type of enrichment influenced the assay sensibility and probably is according to the limit of *L. monocytogenes* growth in primary enrichment (false-negative PCR results) so as the high *Listeria* spp. count in secondary enrichment (false-negative plate count results). The main challenge to detect *L. monocytogenes* by PCR in food samples is the low capacity of the enrichment broth to promote the growth of this microorganism. The improvement of enrichment conditions may help to increase the assay sensibility. Another challenge for food industry is to avoid injured but viable bacteria. For that reason it was also objectified to evaluate a quantitative chromogenic method to isolate injured *L. monocytogenes*. The inactivation of *L. monocytogenes* EGD-e submitted to 400 MPa in 12°C in chicken samples was studied to verify the impact of high pressure treatment in injured bacteria recuperation. Samples were plated onto ALOA and onto the same agar supplemented with 4% NaCl (ALOA-S), before and after different incubation times on 30°C in non-selective broth. Sublethally Injured cells were capable to growth when directly plated on ALOA, therefore they were not capable to growth on non-selective broth. It was observed that high pressure sublethally injured *L. monocytogenes* cells may be quantified by the difference between ALOA and ALOA-S count. Furthermore,

the presence of more than 100 CFU.g⁻¹ injured *L. monocytogenes* can be detected by plating the sample directly onto ALOA.

Key-words: *Listeria monocytogenes*. Detection methods. ALOA. Real Time-PCR. High Pressure

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.2 Fatores de patogenicidade	2
1.3 Os sorogrupos de <i>L. monocytogenes</i>	3
1.4 Multiplicação de <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos e seu controle.....	5
1.5 Altas pressões hidrostáticas	6
1.5.1 Compressão direta	7
1.5.2 Compressão indireta.....	7
1.5.3 Aquecimento do meio de pressão	7
1.6 Injúria e detecção de células injuriadas	12
1.7 Métodos de detecção de <i>L. monocytogenes</i>	15
1.8 PCR em tempo real.....	15
1.9 Objetivos	19
2 Artigo 1: Revisão: Detecção específica de <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos através do uso de métodos comerciais: dos meios de cultivo à PCR em Tempo Real.....	20
Abstract	21
Resumen.....	21
Resumo	22
Introdução	22
Métodos-padrão atuais	24
Isolamento	24
Métodos de referência quanto ao enriquecimento e ao cultivo em placas.....	24
Meios de cultivo cromogênicos.....	26
Confirmação	28
O Gênero <i>Listeria</i>	28
Diferenciação entre as espécies.....	28
Espécies patogênicas	28
Métodos rápidos alternativos para o monitoramento de amostras enriquecidas e/ou confirmação de cultivos	29
Métodos imunológicos	30
Métodos baseados no Ácido Nucléico	31
Hibridização do DNA.....	32
PCR.....	32
Perspectivas futuras dos métodos de detecção para <i>Listeria monocytogenes</i>	34
Métodos de Pré-deteção para concentrar especificamente células de <i>Listeria monocytogenes</i>	35
Testes que utilizam como alvo o RNA	35
Microsatélites ou biochips	36
Biosensores	36
Conclusões	37
Agradecimentos	38
Referências Bibliográficas	38
Figura 1. Visão geral dos métodos de detecção para <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos. Adaptado de Gasanov <i>et al.</i> (2005).	46
Tabela 1. Principais testes laboratoriais para a diferenciação de <i>Listeria monocytogenes</i> ^a	47
Tabela 2. Alguns métodos comerciais utilizados para a detecção ou identificação específica de <i>Listeria monocytogenes</i> ^a	48

Tabela 3. Comparação dos métodos comerciais para avaliação de <i>Listeria monocytogenes</i> ^a em alimentos	49
3 ARTIGO 2: Avaliação do Ágar ALOA quanto sua capacidade em recuperar <i>Listeria monocytogenes</i> injuriada por altas pressões em carne de frango.....	50
ABSTRACT	51
RESUMO	52
INTRODUÇÃO	53
MATERIAL E MÉTODOS.....	55
Cepa bacteriana, meios de cultivo, e condições de crescimento.....	55
Preparo da carne moída de frango.....	56
Inoculação e embalagem a vácuo das amostras de frango	56
Tratamento com altas pressões	56
Análises Microbiológicas	57
Análise de Dados.....	57
RESULTADOS.....	58
Inativação induzida de <i>L. monocytogenes</i> por altas pressões	58
Crescimento da microbiota acompanhante e de <i>L. monocytogenes</i> em ALOA.....	59
Crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em ALOA-S comparado ao ALOA	59
AGRADECIMENTOS	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
TABELA 1: Recuperação de <i>Listeria monocytogenes</i> a partir de amostras tratadas e controles não-tratados com dois meios de cultivo, antes e após 6h de enriquecimento.	65
Fig. 1 Comparação da recuperação de <i>L. monocytogenes</i> com o ALOA (○) e o ALOA-S (●) após o tratamento com alta pressão por 3,5min (400 MPa/12 ^o C) e após enriquecimento em caldo não-seletivo (UVM) por até 24h.	66
4 ARTIGO 3: Avaliação dos Efeitos do Pré-enriquecimento Primário e Secundário para a Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> por PCR em Tempo Real em Carne de Frango Moída.....	67
Abstract	68
Resumo	69
Introdução	70
Materiais e Métodos.....	73
<i>Cepas bacterianas, Meio de Cultivo, Condições de Crescimento</i>	73
<i>Amostras de carne de frango moídas, artificialmente contaminadas</i>	74
<i>Amostras Comerciais de Frango</i>	74
<i>Extração de DNA a partir de cultivos puros e de cultivos em caldo de enriquecimento</i>	75
<i>PCR em Tempo Real</i>	76
RESULTADOS.....	77
<i>Especificidade do teste de PCR em Tempo Real</i>	77
<i>Sensibilidade do teste de PCR com Cultivos Puros</i>	77
<i>Detecção de L. monocytogenes a partir de amostras de carne de frango moída inoculadas artificialmente</i>	78
<i>Detecção de L. monocytogenes e da microbiota acompanhante em amostras comerciais de frango</i>	78
Discussão.....	81
CONCLUSÃO	84
AGRADECIMENTOS	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
TABELA 1. TEMPERATURA DE DISSOCIAÇÃO (T _m) E VALORES C _t OBTIDOS EM PCR A PARTIR DE DIFERENTES CEPAS DE <i>L. monocytogenes</i>	89
TABELA 2. RESULTADOS DA CONTAGEM DE <i>L. monocytogenes</i> EM CULTIVO E EM PCR EM TEMPO REAL APÓS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ENRIQUECIMENTO.....	90
TABELA 3. DETECÇÃO DE <i>L. monocytogenes</i> ATRAVÉS DO SUBCULTIVO EM ÁGAR CROMOGÊNICO (ALOA) E EM PCR EM TEMPO REAL: AMOSTRAS COM RESULTADOS SIMILARES EM CADA TIPO DE ENRIQUECIMENTO.....	91

TABELA 4. DETECÇÃO DE <i>L. monocytogenes</i> ATRAVÉS DE SUBCULTIVO EM ÁGAR CROMOGÊNICO E PCR EM TEMPO REAL: AMOSTRAS COM RESULTADOS SEM CONCORDÂNCIA EM UM OU OUTRO TIPO DE ENRIQUECIMENTO	92
Figura 1. Amplificação da seqüência <i>inlA</i> de células de <i>Listeria monocytogenes</i> por PCR em Tempo Real. Os valores de fluorescência e de <i>Ct</i> foram obtidos de cepas EGD-e inoculadas em amostras de carne de frango homogeneizadas a concentrações de 10^5 (■), 10^4 (*), 10^3 (○), e 10^2 (□)UFC.mL ⁻¹	93
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
6 CONCLUSÕES	99
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 *Listeria monocytogenes*

O advento da industrialização trouxe diversos benefícios para o homem, promovendo diversificação e praticidade no consumo de alimentos. Em contrapartida surgiram novos desafios para o controle de microrganismos veiculados através dos animais e/ou manipuladores e que se instalam no ambiente de processamento dos produtos alimentícios (RITZ, THOLOZAN, FEDERIGHI & PILET, 2002; SACCHETTI, BIANUCCI & AMBROGIANI, 2003; OLIVER, 2006).

Listeria monocytogenes é um bacilo gram-positivo, não formador de esporos, pertencente ao gênero *Listeria* spp. As demais espécies deste gênero (*L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* e *L. ivanovii*) não são consideradas patogênicas ao homem (FARBER & PETERKIN, 1991), ainda que *L. seeligeri* e *L. ivanovii*, em raras ocasiões, estiveram envolvidas em infecções em humanos (Mc LAUCHIN, 1996). Há relativamente pouco tempo esse microrganismo vem sendo estudado como transmissor de doença de origem alimentar.

Listeria monocytogenes é um patógeno bacteriano causador de enfermidade especialmente em seres humanos pertencentes aos grupos de risco, incluindo gestantes, neonatos e adultos imunocomprometidos. Em gestantes, pode ocasionar abortos espontâneos, natimortos ou nascimento de bebês gravemente doentes pela infecção. Os adultos e as grávidas também podem sofrer de listeriose, se estiverem com o sistema imune comprometido, assim como os idosos. Nesses grupos, a doença apresenta-se como meningite e septicemia (ROCOURT, 1996). Embora acometa um grupo especial de pessoas e apresente incidência relativamente baixa, a listeriose está associada a uma alta taxa de mortalidade, podendo aproximar-se a 30% (GRIFFITHS, 1989; DALTON et al., 2004; ILSI RESEARCH FOUNDATION, RISK SCIENCE INSTITUTE, 2005).

1.2 Fatores de patogenicidade

Os mecanismos de patogenicidade ainda estão sendo estudados e a infecção depende de uma variedade de fatores, como o estado imunitário do hospedeiro, a quantidade do inóculo e a particularidade da cepa de *L. monocytogenes* envolvida na infecção. A hemólise é considerada um importante fator na virulência das cepas e alguns sorotipos específicos, como o 1/2a e o 4b são os mais comumente encontrados em surtos (ROCOURT, 1994; MILOHANIC et al., 2004). Para produzir infecção em animais modelos testados (ratos e camundongos), concentrações de 10^8 - 10^9 células são necessárias (CZUPRINSKY & HAAK-FRENDSCHO, 1997).

Existe incerteza se todas as cepas de *L. monocytogenes* são patogênicas, entretanto, o Comitê Assessor sobre segurança microbiológica Alimentar do Reino Unido (ACMSF) recomendou que, para fins de segurança pública, todas as cepas de *L. monocytogenes* devem ser tratadas como potencialmente patogênicas (ICMSF, 1996). No entanto, pela ubiquidade dessa bactéria, sua ausência em alimentos é uma tarefa árdua de ser alcançada, dessa forma, muitas indústrias de produtos alimentícios avaliam *Listeria* spp. como indicador de *L. monocytogenes*, de forma a traçar estratégias de controle desse microrganismo no ambiente de processamento (BELL & KYRIAKIDES, 1998).

Três barreiras do hospedeiro podem ser ultrapassadas por *L. monocytogenes* para causar listeriose: a barreira intestinal, a hemato-encefálica e a placentária (LECUIT & COSSART, 1997). É um microrganismo intracelular facultativo que pode invadir e replicar em células epiteliais e macrófagos: após sua entrada, a bactéria lisa o vacúolo e escapa para o citoplasma celular, onde ocorre sua replicação (COSSART & LECUIT, 1998). No citosol, utiliza o processo de motilidade por ativação da actina para chegar até a membrana da célula e formar a protusão dupla da membrana para invasão com formação de um segundo vacúolo, reiniciando o processo (GREIFFENBERG et al, 1998).

Para invadir a célula, *L. monocytogenes* conta com dois tipos de proteínas de superfície capazes de se aderirem à célula do hospedeiro, denominadas Internalina (*inlA* e *inlB*) (GAILLARD et al., 1991). O receptor da *inlA* na célula do hospedeiro é o ectodomínio E-caderina, enquanto que para a *inlB* o receptor é o fator de crescimento

dos hepatócitos (Met) (MENGAUD et al., 1996). Em algumas cepas, *inlA* apresenta-se na forma truncada (JONQUIERES et al., 1998; OLIER et al., 2003), impedindo sua capacidade original de promover a internalização do microrganismo na célula hospedeira. Um estudo epidemiológico indicou que cepas de amostras clínicas expressaram com maior frequência a proteína completa (96% dos casos) do que cepas isoladas a partir de amostras de alimentos (65% dos casos) (JACQUET et al., 2004).

Outra proteína envolvida na invasão é a *p60*, codificada pelo gene “invasion-associated protein” (*iap*). Já a proteína responsável pela polimerização da actina, é a *ActA* e sua região amino-terminal (aminoácido 31-263), a qual, sozinha, é capaz de induzir o movimento da bactéria no interior da célula invadida (LASA et al., 1997).

Listeriolisina O (LLO) é uma molécula formadora de poro na membrana de células epiteliais do hospedeiro. Além desta, a proteína de 60-kDa (*iap*) secretada pela bactéria, também está envolvida no escape de vacúolos (PORTNOY, JACKS & HINRICHS, 1988; Dissurget et al., 2004). *L. monocytogenes* secreta duas fosfolipases (PLCs) implicadas na lise dos vacúolos intracelulares (GOLDFINE & WADSWORTH, 2002). A fosfatidilinositolfosfolipase C (PI-PLC) é específica para fosfatidilinositol (PI), enquanto que fosfatidilcolina (PC)-PLC é uma PLC que atua no limite externo da membrana vacuolar (GEOFFROY et al., 1991). Trabalhos conduzidos em linhagens de células epiteliais de humanos têm demonstrado que na ausência de LLO, a PC-PLC também pode promover a lise primária dos (GRUNDLING, GONZALEZ & HIGGINS, 2003).

Os genes de virulência de *Listeria* mais importantes (p. ex. *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC* e *hpt*) são regulados pelo ativador transcricional *PrfA* (MENGAUD et al., 1991; DISSURGET et al., 2004). Os fatores de virulência *PrfA*-regulados, tais como a LLO, *PlcA* e *PlcB*, são produzidos em altos níveis quando a temperatura aumenta para 37°C, ou seja, a temperatura do hospedeiro (LEIMEISTER-WACHTER, DOMMAN & CHARABORTY, 1992).

1.3 Os sorogrupos de *L. monocytogenes*

As designações dos sorotipos em *L. monocytogenes* seguem um sistema alfanumérico baseado nos antígenos flagelares (designado por letra) e somático

(designado por número). Em trabalhos realizados com eletroforese com enzima multilocus (MEE) foi demonstrado que os sorotipos 1/2a, 1/2c, 3a e 3c formam uma subdivisão genética a qual é diferente daquela divisão que inclui sorotipos 1/2b, 3b e 4b (BIBB et al., 1989; PIFFARETTI et al., 1989; BIBB et al., 1990). Entretanto, ambas divisões abrigam sorotipos prevalentes em doenças em humanos (1/2a, 1/2b e 3b).

Pesquisas têm demonstrado que a estrutura genética de *L. monocytogenes* é baseada em clones, ou seja, tem origem em diferentes linhagens (PIFFARETTI et al., 1989). A subdivisão dos sorotipos de *L. monocytogenes* foi confirmada por técnicas como Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (MAZURIER et al., 1992), ribotipagem (GRAVES et al., 1994; WIEDMANN et al., 1997), eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (BORSCH, CHEN & LUCHANSKY, 1994; MOORE & DATTA, 1994), e por Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (AARTS, HAKEMULDER & van HOEF, 1999). Assim, os sorotipos foram divididos em dois grandes grupos, sendo que o 1/2a, 1/2c, 3a e 3c pertencem à maior divisão genética (grupo I), enquanto que os sorotipos 1/2b, 3b e 4b são incluídos em outra divisão (grupo II) (BIBB et al., 1989; PIFFARETTI et al., 1989; BIBB et al., 1990).

Verifica-se que 50 a 70% dos surtos de origem alimentar e dos casos esporádicos de listeriose são associados a cepas 4b, sugerindo uma virulência específica potencial desse sorotipo (LARSSON, 1979; ART & ANDRE, 1991; Mc LAUCHILIN, 1990; MARAKUSHA, DARWICH & TARTAKOVSKII, 1996). Mesmo sabendo-se que *L. monocytogenes* apresenta treze sorotipos, 1/2a 1/2b e 4b são os responsáveis por 98% das listerioses relatadas em humanos (JACQUET et al., 2002).

Por outro lado, as razões para o baixo número de casos de amostras de alimentos contaminadas com o sorotipo 4b ainda não estão claras. Diversas teorias têm sido propostas para esclarecer essa evidência, entre as quais a de que é possível que o sorotipo 4b possa ser mais sensível aos meios seletivos de enriquecimento usualmente utilizados na identificação de *L. monocytogenes*, do que outros sorotipos, o que subestimaria sua presença em alimentos e no ambiente de processamento (BRUHN, VOGEL & GRAM, 2005). Além disso, outros sorotipos poderiam possuir maior adaptação aos fatores adversos dos alimentos e do ambiente de processamento pois,

conforme relatam Norwood & Gilmour (1999), cepas do sorotipo 1/2c apresentaram maior capacidade de aderência a superfícies de aço inoxidável do que o sorotipo 4b.

Estudos genéticos continuam a identificar genes essenciais para a virulência de *L. monocytogenes* (ERICSSON et al., 2000; AUTRET et al., 2001; RUDI et al., 2003; CABRITA et al., 2004; FRANCIOSA et al., 2005), porém, grande parte desses estudos é realizada com cepas EGD e 10403S (ambas sorotipo 1/2a) ou com a cepa LO28 (sorotipo 1/2c) e podem não abranger efetivamente todos os atributos de virulência específicos para outros sorotipos com importância clínica, tais como 1/2b e 4b. As cepas dos sorotipos 1/2a e 1/2c pertencem a um dos dois maiores grupos de divisões de *L. monocytogenes*, sendo muito diferentes da divisão que inclui os sorotipos 1/2b e 4b (BIBB et al., 1990; BORSCH, CHEN & LUCHANSKY, 1994).

Alguns sorotipos apresentam uma diversidade genética superior a outros, sendo o 1/2a o que apresenta-se mais diversificado geneticamente (BIBB et al., 1989). A baixa diversidade relativa do sorotipo 4b também foi relatada (GRAVES et al., 1994) e pode sugerir o surgimento desse sorotipo (VAN DER ZEE et al., 1996). Além disso, todas as cepas 1/2c que têm sido avaliadas através de ferramentas de tipificação genética, têm se mostrado indistinguíveis (CARRIERE et al., 1991; NIEDERHAUSER et al., 1994; AARTS, HAKEMULDER & van HOEF, 1999), sugerindo que essa linhagem clonal pode ser muito jovem, pode estar sob forte pressão de seleção, ou ambos.

Diferenciação nas características fisiológicas também foi observada entre os diferentes sorotipos. Ryser et al. (1996), por exemplo, observaram que a recuperação de subtipos relacionados a doença em humanos e daqueles relacionados com carne vermelha ou produtos originários de carne de frango foi dependente do tipo de protocolo de enriquecimento utilizado.

1.4 Multiplicação de *Listeria monocytogenes* em alimentos e seu controle

Para a indústria de alimentos, o crescimento de *L. monocytogenes* em temperaturas de refrigeração e sua sobrevivência em ambientes adversos tornaram o controle de *L. monocytogenes* um desafio (FARBER & PETERKIN, 1991). É capaz de crescer em temperaturas de 0 a 8°C, pH entre 4,39 a 9,4 e atividade de água (A_w) acima de 0,94 (ICMSF, 1996). Por ser um microrganismo ubíquo, as contaminações

nas plantas de processamento e nos alimentos, são especialmente difíceis de controlar, principalmente pela sua capacidade de formar biofilmes na superfície dos equipamentos industriais. Diferentes artigos relatam sua presença no solo (Mac GOWAN et al., 1994), em pescados (BEN EMBAREK, 1994), em vegetais (BEUCHAT, 1996), no leite (KOZAK et al., 1996), e em lingüiça frescal (VON LAER et al., 2005).

Através de pesquisas realizadas em abatedouros de frangos, observou-se que as aves contribuem muito pouco para a contaminação por esse microrganismo (COX, BAILEY & BERRANG, 1997; OJENIYI et al., 1996; OJENIYI, CHRISTIANSEN & BISGAARD, 2000). Em se tratando de pesquisa de prevalência de sorotipos em plantas de processamento, Giovannancci et al. (1999) verificaram que os predominantes foram 1/2a, 1/2c, 3a e 3c. A persistência de determinadas cepas ou linhagens no meio ambiente industrial foi demonstrada em um trabalho realizado por pesquisadores do *Centers for Disease Control* (CDC, 2000), onde a cepa implicada em um surto de listeriose nos EUA envolvendo carne de peru contaminada, aparentemente persistiu no ambiente de processamento por mais de 10 anos.

Pesquisadores e indústria vêm unindo esforços no controle da contaminação dos alimentos por *L. monocytogenes* e, ao longo dos tempos, várias formas de controle de microrganismos patogênicos nos alimentos vêm sendo testadas. Diferentes tecnologias são avaliadas para esse fim, tais como o uso da irradiação, campos elétricos pulsantes, adição de bacteriocinas, campos magnéticos oscilatórios, pulsos luminosos, altas pressões hidrostáticas (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 1998) ou mesmo a combinação de vários tratamentos (GARCIA-GRAELLS, VALCKZ & MICHIELS, 2000; WUYTACK et al., 2003; GARRIGA et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2005). Esses tratamentos alternativos têm a intenção de diminuir as alterações sensoriais e nutricionais dos alimentos.

1.5 Altas pressões hidrostáticas

A alta pressão hidrostática é utilizada para a inativação de microrganismos e de certas enzimas, bem como para aumentar a vida útil dos alimentos (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 1998). De acordo com esses autores, as altas pressões podem ser geradas das seguintes formas:

1.5.1 Compressão direta

Gerada por pressurização de um meio com a parte final de um pistão de diâmetro pequeno. Nesse método, a forma de compressão é muito rápida, porém as limitações do fechamento dinâmico de alta pressão entre o pistão e a superfície interna da câmara limitam seu uso para laboratório ou sistemas de planta-piloto;

1.5.2 Compressão indireta

Utiliza um intensificador de alta pressão para bombear o meio de pressão, sendo utilizada pela maioria das indústrias;

1.5.3 Aquecimento do meio de pressão

Utiliza a expansão do meio de pressão mediante o aumento da temperatura. Isto requer maior controle da temperatura com o volume interno da câmara de pressão.

Em razão de que o líquido provoca uma pequena mudança de volume, as câmaras de alta pressão utilizam água, já que não apresentam os perigos de operação das câmaras que utilizam gases comprimidos (FARR, 1990). O alimento é colocado sob pressão por um determinado tempo, o qual depende do tipo de alimento e da temperatura do processo. No final do tempo de processamento, a câmara é descomprimida para retirada da carga tratada (ZIMMERMAN & BERGMAN, 1993).

A alta pressão pode ser combinada com temperaturas altas moderadas, deixando de haver a necessidade de pressões extremamente altas (MORRIS, 1993; ALPA et al., 2000). Para a indústria de alimentos, o interessante é a utilização de câmaras de pressão capazes de processar grandes volumes e o equipamento resistir a pressões elevadas por vários ciclos.

A câmara de pressão deve possuir um tempo de ciclo curto, ser fácil de limpar e segura de operar, com controles de processo precisos. Do ponto de vista industrial, é desejável o desenvolvimento de processos contínuos de pressurização para baixar os custos operacionais (DEPLACE & MERTENS, 1992). A maioria desses objetivos já foi alcançada, porém pesquisas ainda vêm sendo desenvolvidas para o aprimoramento do uso dos equipamentos de alta pressão (NELSON, SHUPPENHAUER & CLARK, 1992; SOINI et al., 2002; DATTA et al., 2005).

1.5.4 Alterações nos microrganismos devido a altas pressões

Os diversos efeitos das altas pressões sobre os alimentos e os microrganismos têm sido estudados há décadas.

A alta pressão desnatura proteínas e reduz o tamanho de fosfolipídios na membrana celular, inibindo a captação de aminoácidos essenciais para o crescimento da célula. Com a alta pressão, os conteúdos celulares extravasam para o exterior em decorrência do aumento da permeabilidade da membrana ou mesmo sua ruptura com conseqüente morte celular, no caso de pressões extremamente altas. Se a pressão aplicada for relativamente baixa, a célula pode recuperar a permeabilidade original (FARR, 1990).

As reações enzimáticas se vêem alteradas pelas altas pressões, podendo tanto ativá-las como inativá-las. A atividade do succinato, formato e malato desidrogenase em *E. coli* diminui com o aumento da pressão. As desidrogenases sujeitas a uma pressão de 100 MPa durante 15 min a 27°C se inativam completamente (MORITA, 1957). A inativação da enzima se dá por alteração pela pressão nas estruturas intramoleculares ou por mudanças conformacionais em pontos ativos. A inativação de algumas enzimas pressurizadas a 100 e 300 MPa é irreversível. A reativação após a descompressão depende do grau de distorção da molécula. A possibilidade de reativação diminui com o aumento da pressão acima de 300 MPa (SUZUKI & SUZUKI, 1963; JAENICKE, 1981). A inativação de enzimas está influenciada pelo pH, concentração de substrato, estrutura subunitária da enzima e a temperatura de pressurização (HOOVER et al., 1989).

O DNA é mais resistente que a proteína à ação das altas pressões e isso se deve a estabilidade conferida pelas ligações de pontes de hidrogênio durante o emprego da pressão, enquanto que as temperaturas altas provocam a desnaturação de moléculas de DNA. Heden (1964) não observou desnaturação do DNA quando submeteu *Bacillus subtilis* a pressões de até 100 Mpa a temperatura ambiente. Porém, a transcrição e replicação de DNA cessaram com o emprego da alta pressão por inativação de enzimas.

Quanto aos efeitos fisiológicos de células de *L. monocytogenes* inoculadas em caldo citrato e tratadas com 400 MPa /10 min, Ritz et al. (2002) afirmam que após o

tratamento não houve crescimento celular em *Plate Count Agar* (PCA) e que a microscopia eletrônica de varredura revelou que a morfologia celular não foi afetada. Houve pouco ou nenhum dano na membrana celular, embora o potencial de membrana tenha sido reduzido de -86 para -5 mV. Certamente este resultado indica a razão das células não terem crescido no ágar, já que o potencial de membrana é o responsável pelas trocas iônicas da célula com o meio, impedindo seu crescimento e replicação.

A inativação de *L. monocytogenes* e *Vibrio parahaemolyticus* foi pesquisada por Styles, Hoover & Farkas (1991), os quais foram estudados em caldo tamponado e em alimento. A pressão de 238 MPa não proporcionou declínio na população celular, porém, a 272 , houve uma redução ao redor de 3 ciclos logarítmicos naqueles inoculados na solução tampão. A 306 MPa a população bacteriana foi reduzida em 3 ciclos logarítmicos em 20 min e, a 340 MPa, sobreviveram menos de 10 UFC.mL^{-1} . Na década de 70, Zobell (1970) já afirmava que a pressão limite de tolerância é menor em soluções salinas sem nutrientes do que em presença de aminoácidos essenciais e vitaminas.

Pesquisa realizada com cepas resistentes e cepas sensíveis às altas pressões, demonstrou que cepa *L. monocytogenes* CA foi mais resistente a pressão do que *L. monocytogenes* OH₂ (ALPA et al., 2000). Esses autores observaram que, partindo-se de uma população de $8 \text{ Log}_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$, em um tratamento de 345 MPa por 5 min a 25°C , a redução logarítmica foi de 0,86 Log_{10} e 2,64 Log_{10} para *L. monocytogenes* CA e *L. monocytogenes* OH₂, respectivamente. Quando o tempo do tratamento foi alterado para 10 min, a cepa mais resistente e a mais sensível apresentaram redução de 2,40 e 3,05 Log_{10} , respectivamente. Já quando a temperatura foi aumentada para 50°C , ambas cepas tiveram uma redução logarítmica de 8 Log_{10} , não havendo, então, diferença quando uma temperatura relativamente alta foi aplicada em conjunto com as altas pressões.

A diferença da ação das altas pressões sobre *L. monocytogenes* em diferentes matrizes alimentares foi avaliada por Dogan & Erkmen (2004) que, ao testarem pressões entre 300 a 600 MPa, observaram que o valor *D* com pressão de 400 MPa foi de 6, 3'9 e 1'8 para leite, suco de pêra e suco de laranja, respectivamente. O maior

tempo para uma redução logarítmica de *L. monocytogenes* foi na matriz leite, indicando a proteção dos constituintes desse produto para a inativação do microrganismo.

Além da diferença no controle de *L. monocytogenes* nos diversos tipos de alimentos, Tay et al. (2003) também encontraram diferença entre cepas de *Listeria*. A 400 MPa/30°C por 1 min, a redução nas diferentes cepas foi de 1,4 a 4,3 unidades logarítmicas, enquanto que o tratamento a 500 MPa causou uma redução de 8 Log₁₀ em todas as cepas, exceto para *L. monocytogenes* OSY-8578 (3,9 logs), OSY-8732 (6,8 logs) e v7 (7,3 logs). Scott A foi a cepa que apresentou maior sensibilidade.

Quanto às alterações na membrana de *L. monocytogenes* Scott A, tratada a 345 MPa por 5 min a 25°C, Kalchayanand et al. (2004) observaram apenas a perda da forma granular da superfície, além de uma redução de 1 a 2 ciclos logarítmicos. Já quando o tratamento foi combinado com o uso de bacteriocinas, a redução aumentou para 6 a 7 Log₁₀.

Em outro estudo (LI & XU, 2005), *L. monocytogenes* NCTC 11994 apresentou redução de 7 Log₁₀ quando foi utilizado 400 MPa/10 min, além de mudanças no pH intracelular, diminuição do potencial de membrana, exsudação do potássio interno e decréscimo na concentração do ATP.

Em *E. coli*, verificou-se estresse oxidativo quando se empregaram pressões acima de 400 MPa – já a 200 MPa são capazes de iniciar a inativação das células – e fez com que os autores sugerissem que, sob algumas condições, a inativação desse microrganismo por altas pressões fosse em consequência de um mecanismo de suicídio envolvendo a indução de uma queima oxidativa endógena (AERTSEN et al., 2005).

Quando *L. monocytogenes* Scott A foi inoculada em queijo, a população de 7 Log₁₀ reduziu apenas um (1) ciclo logarítmico quando exposta a 300 MPa/10'/10°C. Em contrapartida, a redução foi de 5 Log₁₀ quando a pressão foi aumentada para 500 MPa/5' sob a mesma temperatura (ARQUES et al., 2005).

Ao utilizarem diferentes pressões (0,1 a 690 MPa a 21°C/10') em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, Chen, Guan & Hoover (2006) concluíram que a ordem de maior resistência às pressões foi *Shigella flexneri* > *Staphylococcus aureus* aproximadamente igual a *E. coli* O157H7 > *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis > *S.*

enterica sorovar Typhimurium > *L. monocytogenes* > *Yersinia enterocolitica* > *Vibrio parahaemolyticus*.

1.5.5 Qualidade sensorial e conservação dos alimentos tratados por altas pressões

A desnaturação das proteínas por alta pressão é complexa e depende da estrutura da proteína, do intervalo de pressão, do pH e da composição do dissolvente (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 1998).

Carlez et al. (1994) ao estudarem a vida útil de carne bovina picada armazenada a 3°C, demonstraram que com o emprego de 200 MPa por 20min a 20°C, a deterioração desse alimento iniciou após 2 dias. Quando se empregou 300 MPa, a deterioração passou a ocorrer após 6 dias e, quando a pressão foi de 400 a 450 MPa, a vida útil aumentou para 6 a 13 dias.

De acordo com o alimento e com a pressão aplicada, diferentes mudanças sensoriais podem ocorrer. Por exemplo, a estrutura interna dos tomates torna-se mais firme, os tecidos de frangos e peixes tornam-se mais opacos e a carne bovina no pré-rigor fica mais macia (HOOVER et al., 1989).

As alterações físicas no músculo induzidas por altas pressões incluem a separação das camadas do sarcolema e do endomísio, e a ruptura dos espaços miofibrilares e intermiofibrilares. Pode ocorrer o desaparecimento dos grânulos de glicogênio, o aumento do tamanho das mitocôndrias e d retículo sarcoplasmático e, em alguns casos, a ruptura de mitocôndrias. A interação entre os efeitos físicos e químicos no tecido muscular interfere no efeito de amaciamento pelas altas pressões (EUGASIM & KENNICK, 1982).

As altas pressões também podem ser utilizadas para o descongelamento de matérias-primas, já que o realiza de forma uniforme. É um processo rápido quando os alimentos contêm maior conteúdo de sólidos solúveis, como o NaCl e açúcares (CHEFTEL, 1992).

Curiosamente, as proteínas oligoméricas são dissociadas a 200 MPa, enquanto que a desnaturação de proteínas de cadeia simples ocorre acima de 300 . A alta pressão provoca a desprotonação de grupos carregados, ruptura de pontes salinas e

enlaces hidrofóbicos, com o qual se produzem modificações conformacionais e estruturais nas proteínas. As mudanças de hidratação são a principal causa da diminuição do volume relacionados com a dissociação das proteínas (HAYASHI, KAWAMURA & KUNUGI, 1987). A 800 MPa de pressão, por 20-120 min, houve formação de agregados protéicos de diferentes tratamentos quando Patel et al. (2005) testaram distintas soluções de concentrados protéicos (12% p/v, pH 6,65, +/-0,05). Esses agregados alteraram a viscosidade e a opacidade de amostras e estavam ligados por pontes dissulfídicas intermoleculares e por interações não-covalentes.

A inativação de enzimas proteolíticas da carne, tais como as catepsinas D, E, L e a ácido fosfatase, aumenta ao aplicar-se pressão entre 100 a 500 MPa durante 5 min a 2^oC (HOMMA, IKEUCHI & SUZUKI, 1994). No entanto, o aumento da atividade de enzimas proteolíticas endógenas do músculo devido a alta pressão também pode contribuir para o amaciamento da carne (HOMMA, IKEUCHI & SUZUKI, 1994).

1.6 Injúria e detecção de células injuriadas

A falha na identificação de patógenos submetidos a injúria celular pode ter efeitos adversos, assim como causar perdas econômicas substanciais. Como exemplo, cepas de *L. monocytogenes* injuriadas pelo calor foram capazes de crescer em meios ricos tais como *Tryptic Soy Agar* (TSA), mas foram inibidas na presença de 4% de NaCl (BEUCHAT et al., 1986).

Os caldos de enriquecimento seletivo para *Listeria* contêm várias combinações de antibióticos e outros produtos químicos como acriflavina, cicloheximida, ácido nalidíxico, cefotetano, polimixina B, fosfomicina, sulfato de colistina, cloreto de lítio e esculina (CURTIS & LEE, 1995). Esses compostos são utilizados para evitar o crescimento da flora competidora, entretanto, podem afetar a multiplicação de *Listeria* presente em alimentos que sofreram algum tipo de processamento para controle sanitário. Porém, a detecção de células viáveis de patógenos bacterianos que porventura estejam injuriadas após um processamento é essencial para a segurança dos alimentos (RYSER & MARTH, 1999).

A viabilidade das células é usualmente identificada pela habilidade das bactérias em crescer e formar colônias em meio de cultivo. Entretanto, foi demonstrado

que células não cultiváveis podem ser consideradas viáveis baseando-se no seu metabolismo, atividade enzimática ou integridade da membrana (BARER & HARWOOD, 1999). Devido aos diferentes processamentos que recebem os alimentos, o uso de meios de cultivo capazes de recuperar as células injuriadas torna-se de extrema importância na avaliação do método de controle da contaminação pela bactéria patogênica (RYSER & MARTH, 1999).

Pouco foi feito para o desenvolvimento e avaliação de meios de cultivo seletivos e diferenciais para o isolamento de células de *Listeria* subletalmente injuriadas a partir de alimentos contaminados (WU et al., 2001). A maioria dos meios de cultura recomendados para o isolamento de *L. monocytogenes* injuriada subletalmente não possuem nenhum grau de seletividade porque os agentes seletivos inibem o reparo dessas células (DONNELLY, 2002).

Mesmo técnicas moleculares de detecção de células viáveis, como a identificação de RNA mensageiros através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), demonstrou-se falha na identificação de baixos níveis de células injuriadas pelo calor. Até mesmo a combinação de métodos de detecção de células injuriadas tem sido sugerida, como a microscopia eletrônica em conjunto com o plaqueamento direto em meio seletivo apropriado (NOVAK & JUNEJA, 2001).

O controle de qualidade e da inocuidade de alimentos comumente utiliza métodos microbiológicos tradicionais, entre os quais, destaca-se a contagem microbiana em placas, utilizando meios de cultura seletivos, a qual apresenta numerosas limitações, pois a capacidade de uma célula para formar uma colônia depende de um grande número de fatores, que incluem o estado fisiológico das células, o meio de cultivo empregado na contagem, a temperatura de incubação, entre outros (DONNELLY, 2002). Destaca-se que o *Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti* (ALOA), desenvolvido primeiramente como um meio seletivo diferencial para *L. monocytogenes* (OTTAVIANI et al., 1998), tem demonstrado ser eficiente para recuperar células injuriadas de *Listeria* (VLAEMIYNCK et al., 2000).

Wuytack et al. (2003) testaram diferentes métodos não-térmicos de processamento de alimentos, como a homogeneização por altas pressões, altas pressões hidrostáticas, pulsos luminosos e campos elétricos pulsados, e avaliaram se

havia presença de células injuriadas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium após esses processamentos. A identificação de células injuriadas foi realizada por plaqueamento em TSA acrescentado de 3% de NaCl, sendo verificado que o maior número de células injuriadas foi obtido após a utilização de altas pressões hidrostáticas.

Diferentes meios de pré-enriquecimento, tais como Caldo Otimizado *Penn State University* (oPSU), *Listeria Enrichment Broth* (LEB), *LEB Buffer* (BLEB) e BLEB Modificado (MBLEB) foram testados para se verificar o mais eficiente na recuperação de células injuriadas por altas pressões (450 MPa/15' ou 600 MPa por 1,5') inoculadas em leite (BULL et al., 2005). O caldo oPSU aumentou significativamente a recuperação de *L. monocytogenes* após o emprego das altas pressões, e foi 63 vezes mais eficiente que os demais meios de pré-enriquecimento. Apesar da capacidade da recuperação celular, são necessárias no mínimo 24 a 72h de incubação a 4, 15 e 30°C para o crescimento celular em ágar.

Com o lançamento de novos produtos “prontos para o consumo” e, especialmente, com o desenvolvimento de novos métodos de processamento dos alimentos, faz-se necessária a existência de técnicas que supram as lacunas na detecção de células microbianas viáveis mas não cultiváveis, em alimentos submetidos a novas tecnologias de processamento, proporcionando, tanto diminuição do tempo de análise, quanto a sensibilidade e especificidade para a detecção e para a identificação de patógenos.

Por essa razão, torna-se fundamental a identificação das células que não foram destruídas durante o processamento, denominadas de células injuriadas, as quais permanecem viáveis, porém não cultiváveis. A detecção dessas células é de grande importância para a segurança dos alimentos, pois, se estas não forem detectadas, podem sofrer o processo de reparo do dano celular e multiplicarem-se antes do consumo, representando um grave problema para a saúde dos consumidores. Este reparo pode ocorrer especialmente com as bactérias psicrófilas como *Listeria monocytogenes*, que é capaz de sobreviver e crescer nos alimentos refrigerados.

1.7 Métodos de detecção de *L. monocytogenes*

Inicialmente, os métodos de identificação e detecção de *L. monocytogenes* foram desenvolvidos para amostras clínicas (Mc BRIDE & GIRARD, 1960; WOOD, 1969). A partir dos anos 80, quando o microrganismo começou a ser considerado patógeno de origem alimentar, métodos cada vez mais eficazes têm sido desenvolvidos e idealizados para amostras alimentares e clínicas (FRASIER, 1988; KURTIS & LEE, 1995; FENG, 1997; HOFFMAN & WIEDMANN, 2001; KOO & JAYKUS, 2003; MORGAN et al., 2005).

Devido às condições do ambiente de processamento dos alimentos (temperatura, umidade, má higienização, em alguns casos), que favorecem a proliferação de *L. monocytogenes*, torna-se essencial o emprego de meios de cultivo mais sensíveis para detectar a presença desse microrganismo (SACCHETTI, BIANUCCI & AMBROGIANI, 2003). Quanto mais confiável for a informação obtida, mais eficazes serão as medidas de controle.

Normalmente, nos laboratórios das indústrias e nas atividades de rotina em laboratórios que prestam serviços de avaliação microbiológica em alimentos, são utilizados os métodos convencionais para a detecção e identificação de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*. O mais comum é avaliar-se a presença/ausência desse microrganismo em 25g de amostra, porém, em casos de risco confirmado para a saúde pública - como quando se identifica a presença de sorotipos relacionados a surtos - a contagem por grama de amostra deve ser realizada (ROCOURT, 1994).

Os métodos convencionais podem levar 3 ou 4 dias em caso de ausência de *Listeria* spp., e 2 a 7 dias mais para a confirmação de *L. monocytogenes*. Por isso a necessidade das indústrias de utilizarem métodos alternativos, mais simples, mais rápidos e menos laboriosos.

1.8 PCR em tempo real

A tecnologia da reação em cadeia da polimerase vem sendo incrementada para aprimorar a obtenção de resultados rápidos. A PCR a tempo real (*Real-Time PCR*) tem seus princípios funcionais parecidos com a PCR tradicional, porém, com diferenças no formato de leitura dos resultados. Essa técnica é altamente específica e pode

quantificar com precisão um DNA-alvo – o qual está diretamente relacionado ao tamanho da população bacteriana presente na amostra – e sua quantificação é baseada na emissão da fluorescência de acordo com o aumento do número de ciclos de PCR, eliminando manipulações pós-PCR, o que ocorre na técnica convencional (RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2004).

A primeira etapa consiste na extração e purificação do DNA, seguida da amplificação de um segmento selecionado do genoma do microrganismo mediante a reação em cadeia da polimerase, ou seja, a PCR propriamente dita. Por último ocorre a detecção dos fragmentos amplificados na PCR, o que na técnica tradicional ocorre por eletroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídio.

Na PCR a tempo real (PCR-TR), os processos de amplificação e detecção ocorrem de maneira simultânea no mesmo tubo fechado, sem a necessidade de nenhuma ação posterior. Além disso, mediante a detecção por fluorescência pode-se medir, durante a amplificação, a quantidade de DNA sintetizado em cada momento, já que a emissão de fluorescência produzida na reação é proporcional à quantidade de DNA formado. Isso permite conhecer e registrar em todo momento a cinética da reação de amplificação (HIGUCHI et al., 1993).

Os termocicladores da PCR-TR incorporam um leitor de fluorescência e estão desenhados para poder medir, em qualquer momento, a fluorescência emitida em cada um dos tubos onde se realize a amplificação. Os sistemas de detecção por fluorescência empregados na PCR-TR podem ser de dois tipos: os agentes intercalantes e as sondas específicas marcadas com fluorocromos (HIGUCHI et al., 1993).

Os **agentes intercalantes** são fluorocromos que aumentam a emissão de fluorescência quando se unem ao DNA de cadeia dupla. O mais empregado na PCR-TR é o *SYBR Green*. Esse sistema de detecção tem a vantagem de que a otimização das condições da reação é muito fácil e também é mais barato que as sondas específicas. O principal inconveniente é sua baixa especificidade, devido a que se unem, inespecificamente, a qualquer produto gerado ou a dímeros de iniciadores (HIGUCHI et al., 1993). Para melhorar a especificidade devem ser empregadas condições de reação ótimas e uma seleção cuidadosa dos iniciadores, de forma a diminuir o risco de

formação de dímeros, além de se iniciar a reação de síntese do DNA com temperaturas elevadas para diminuir a formação de dímeros (TEO et al., 2002; LIND et al., 2006).

Na maioria dos equipamentos de PCR-TR há a possibilidade de determinar a temperatura de fusão dos fragmentos amplificados (T_m = temperatura a que 50% do DNA da molécula está desnaturado). Cada fragmento amplificado tem uma T_m característica, que depende, sobretudo, de sua longitude e da composição de suas bases (SCHRANK & SILVA, 2001). Esta aplicação permite comprovar a especificidade dos fragmentos detectados na PCR.

As **sondas de hibridização** são marcadas com dois tipos de fluorocromos: um doador e outro receptor. O processo baseia-se na transferência de energia fluorescente mediante ressonância entre as duas moléculas. As mais utilizadas são as sondas de hidrólise, denominadas também TaqMan, as sondas *molecular beacons* e as sondas FRET (NIESTES, 2001).

As sondas TaqMan são oligonucleotídeos marcados com um fluorocromo doador na extremidade 5' que emite fluorescência ao ser excitado, e um aceptor na extremidade 3' que absorve a fluorescência liberada pelo doador quando as moléculas doadora e receptora estiverem próximas uma a outra. Enquanto a sonda está intacta, a fluorescência emitida pelo doador é absorvida pelo aceptor, porém, no momento em que ocorre a amplificação do DNA alvo, a sonda se hibridiza com a cadeia complementar. Ao se deslocar ao longo da fita de DNA, em sua ação de síntese, a DNA polimerase, que tem atividade exonuclease 5', hidroliza a extremidade livre 5' da sonda, liberando o fluorocromo doador (HOLLAND et al., 1991). Quando o doador e o aceptor estão afastados, a fluorescência emitida é captada pelo leitor.

Molecular beacons são sondas parecidas com as TaqMan, porém, apresentam uma estrutura secundária em forma de alça, onde localiza-se a seqüência de união específica com o DNA alvo (TYAGI & KRAMER, 1996). As extremidades permanecem ligadas quando a sonda não está hibridizada, fazendo com que doador e receptor estejam muito próximos. Nessa conformação, a fluorescência emitida pelo doador é absorvida pelo aceptor e não é captada pelo leitor do equipamento, porém, quando ocorre a hibridação, a sonda se abre, afastando-se doador e receptor, podendo ser detectada a fluorescência emitida pelo primeiro (NUTIU & LI, 2002).

As sondas FRET são duas sondas que se unem a seqüências adjacentes ao DNA alvo. Uma das sondas leva um doador na extremidade 3' e, a outra, um acceptor na extremidade 5'. Quando as sondas estão hibridizadas, os dois fluorocromos estão próximos. Ao ser excitado, o doador transfere sua energia ao acceptor, o qual emite a fluorescência detectada pelo leitor do equipamento (NIESTES, 2001).

Na PCR-TR o programa de informática vai registrando o incremento de fluorescência em cada ciclo, e esta informação é lançada na forma de gráfico em curva de cinética da reação para cada uma das amostras e controles, calculando o número do ciclo em que o leitor inicia a detectar um aumento significativo da fluorescência. O ciclo onde se inicia a detecção do aumento de fluorescência denomina-se *threshold cycle* (Ct), ou ponto de corte (STRATAGENE MANUAL, 2006).

Com as concentrações previamente conhecidas dos controles externos e seus Cts correspondentes, se desenha uma curva padrão, a fim de se quantificar o DNA alvo (KUHNE & OSHMANN, 2002). Quando interpolamos a essa curva os valores de Ct de cada amostra de campo, pode-se inferir sua concentração de DNA inicial.

A análise da curva de dissociação se baseia na aplicação de um gradiente de temperaturas crescentes depois da PCR para monitorar a cinética de dissociação dos fragmentos amplificados. Mediante esta aplicação, pode-se determinar a Tm dos produtos amplificados para comprovar sua especificidade (AKEY et al., 2002).

Hein et al. (2001), ao estudarem a detecção e quantificação de *L. monocytogenes* em amostras de leite contaminadas artificialmente, encontraram alta sensibilidade (a partir de 6 cópias do gene *iap*) quando amostras puras de DNA foram utilizadas. Já em amostras de leite contendo *L. monocytogenes*, a sensibilidade do teste foi equivalente ao método padrão de plaqueamento, porém a PCR quantitativa em tempo real foi capaz de detectar concentrações celulares de 1 a 2 ciclos logarítmicos a menos que a metodologia padrão.

Hough et al. (2002), ao pesquisarem a enumeração de *L. monocytogenes* em amostras de repolho contaminadas artificialmente, observaram que, ao utilizarem cultivos puros dos microrganismos, a técnica de PCR em tempo real demonstrou resultados de aumento linear a partir de 7 ciclos logarítmicos. Quando amostras do microrganismo eram inoculadas na matriz alimentar, a linearidade do resultado da

reação também apresentou-se a partir de 7 ciclos logarítmicos (de $1,4 \times 10^2$ a $1,4 \times 10^9$ UFC. 25g amostra⁻¹). Porém, tal metodologia não permitiu a detecção de baixos números do microrganismo, o que é mais usual de ocorrer.

A maioria dos testes PCR para a identificação de *L. monocytogenes* estão baseados na detecção dos genes *hly* e *iap*, os quais codificam para a hemolisina listeriolisina O (MENGAUD et al., 1988) e para a proteína de superfície p60 associada a invasão (KÖHLER et al., 1990), respectivamente. Porém, enquanto o gene *hly* não apresenta significativa alteração na sequência nucleotídica em cepas de *L. monocytogenes*, o gene *iap* não apresenta tal característica, possuindo alta variabilidade gênica (polimorfismo) em sua região central, mesmo em cepas de mesmo sorovar (BUBERT, KÖHLER & BOEBEL, 1992; MANZANO et al., 1997). Para RODRÍGUEZ-LÁZARO et al. (2004), o gene *hly* foi capaz de quantificar as mais de 100 cepas de *L. monocytogenes* testadas em PCR em tempo real. Já quando o gene *iap* foi utilizado, as contagens bacterianas foram subestimadas em 3 a 4 unidades logarítmicas, de acordo com o número de variabilidade da sequência gênica nos diferentes sorovares analisados.

1.9 Objetivos

- Avaliar um método cromogênico (ALOA) quantitativo para o isolamento de células de *Listeria monocytogenes* injuriada subletalmente a partir de alimentos processados por altas pressões hidrostáticas;
- Avaliar um PCR em tempo real, com uso de caldos de pré-enriquecimento, para detectar baixos números de *L. monocytogenes* naturalmente presente em carne de frango e compará-lo com a metodologia tradicional de cultivo em placa.

2 Artigo 1: Revisão: Detecção específica de *Listeria monocytogenes* em alimentos através do uso de métodos comerciais: dos meios de cultivo à PCR em Tempo Real

Abstract

Review: Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR

Listeriosis is one of the most important food-borne diseases. A variety of culture and rapid methods are available for the detection of *Listeria* spp. in foods. Although the presence of *L. innocua* may indicate potential contamination with *L. monocytogenes*, only the latter species is pathogenic for humans. Therefore, the most adequate tests are those which specifically detect *L. monocytogenes*. Chromogenic media is currently the most common method used for the presumptive identification of *L. monocytogenes*. Some tests like those based on antigen detection are fast and easily applied, but only a few may specifically detect *L. monocytogenes*. Real-time polymerase chain reaction is increasingly applied in food diagnostics for the detection of *L. monocytogenes* due to the availability of different specific commercial test methods. Microarrays and biosensors are some examples of new technologies that might be used routinely for the detection of *L. monocytogenes* in foods in the future.

Additional key words: food-borne listeriae, human pathogenic species, alternative rapid commercial methods.

Resumen

Revisión: Detección específica de *Listeria monocytogenes* en alimentos mediante métodos comerciales: de los medios cromogénicos a la PCR a tiempo real

La listeriosis es una de las enfermedades transmitidas por alimentos más importantes. Existen diferentes técnicas de cultivo y métodos rápidos para detectar *Listeria* spp. en los alimentos. Aunque la presencia de *L. innocua* puede indicar una contaminación potencial con *L. monocytogenes*, esta última especie es la única patógena para el hombre. Los métodos más adecuados son, por tanto, los que detectan específicamente *L. monocytogenes*. El aislamiento en medios cromogénicos es el método más utilizado actualmente para identificar *L. monocytogenes* de forma presuntiva. Los métodos rápidos basados en la detección de antígenos son de uso sencillo, pero existen muy pocos que detecten

específicamente *L. monocytogenes*. La reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real está cada vez más implantada en la industria alimentaria debido a que existen diferentes métodos comerciales específicos para *L. monocytogenes*. Los *microarrays* y los biosensores son algunos ejemplos de las nuevas tecnologías que se podrán utilizar en el futuro para detectar *L. monocytogenes* en los alimentos.

Palabras clave adicionales: *Listeria* en alimentos, especie patógena para el hombre, métodos comerciales rápidos alternativos.

Resumo

Revisão: Detecção específica de *Listeria monocytogenes* em alimentos mediante métodos comerciais: dos meios de cultivo cromogênicos a PCR em tempo real

A listeriose é uma das mais importantes enfermidades transmitidas por alimentos. Existem diferentes técnicas de cultivo e métodos rápidos para detectar *Listeria* spp. em alimentos. Ainda que a presença de *L. innocua* possa indicar uma contaminação potencial por *L. monocytogenes*, essa última espécie é a única patógena para o homem. Os métodos mais adequados são, portanto, os que atualmente detectam de forma presuntiva a presença de *L. monocytogenes*. Os métodos rápidos baseados na detecção de antígenos são de uso fácil, porém são poucos os que detectam especificamente *L. monocytogenes*. A reação em cadeia da polimerase a tempo real está cada vez mais implantada na indústria alimentaria devido a existência de diferentes métodos comerciais específicos para *L. monocytogenes*. A técnica com a utilização de *microarrays* e com os biosensores são alguns exemplos das novas tecnologias que poderão ser utilizadas no futuro para detectar-se *L. monocytogenes* nos alimentos.

Palavras-Chave adicionais: *Listeria* em alimentos, espécie patógena para o homem, métodos comerciais rápidos alternativos.

Introdução

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva que apresenta seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, e *L. grayi*. Dentre essas, somente *L. monocytogenes* está associada comumente com a listeriose humana, enquanto que *L. ivanovii* é patogênica para outros mamíferos. *L.*

1 *monocytogenes* tem sido amplamente estudada nas últimas décadas por sua
2 importância como patógeno de origem alimentar (Swaminathan, 2001; Ryser and
3 Marth, 2004). Esforços contínuos são necessários para se reduzir a incidência de
4 listeriose, de acordo com a manifestação da alta taxa de mortalidade (ILSI Research
5 Foundation-Risk Science Institute, 2005).

6 A presença de *L. monocytogenes* tem sido amplamente observada em alimentos,
7 no meio-ambiente e em amostras clínicas. Sua detecção e identificação em
8 alimentos, tradicionalmente envolve métodos de cultivo baseados em pré-
9 enriquecimento seletivo, enriquecimento, e cultivo em placa. Esses passos são
10 seguidos por caracterização de *Listeria* spp. através da morfologia da colônia,
11 fermentação de açúcares e propriedade hemolítica (Gasnov *et al.*, 2005; Paoli *et*
12 *al.*, 2005) (Fig. 1; Tabela 1). Os métodos microbiológicos convencionais usualmente
13 apresentam uma alta sensibilidade, sendo considerados como “padrão ouro” quando
14 comparados a outros métodos. Esses métodos são particularmente importantes
15 quando o cultivo bacteriano é necessário como resultado final de amostras positivas.
16 Embora um resultado negativo possa ser confirmado em 3-4 dias, o tempo para um
17 resultado positivo normalmente leva 5-7 dias (Paoli *et al.*, 2005). Como normalmente
18 não é possível armazenar produtos alimentares por 7 dias antes de sua distribuição,
19 a indústria alimentária necessita métodos mais rápidos para a detecção de *L.*
20 *monocytogenes*.

21 A detecção de *L. monocytogenes* em alimentos também é dificultada pela alta
22 população da microbiota competitiva, pelo baixo nível de contagem do patógeno, e
23 pela interferência de componentes alimentares inibidores (Norton, 2002).

24 Como um reflexo desta situação, nos últimos anos tem havido um
25 desenvolvimento notável nos novos meios de cultivo para o aprimoramento da
26 detecção de *L. monocytogenes* em alimentos, e métodos eficientes baseados em
27 anticorpos ou em técnicas moleculares também tem sido desenvolvidas (Fig. 1)
28 (Rijpens and Herman, 2002; Gasnov *et al.*, 2005; Paoli *et al.*, 2005). Enquanto
29 vários destes novos testes possuem sensibilidade equivalente, eles são mais
30 rápidos e permitem que o teste seja completado em 48 h.

31 Antes de se decidir sobre a seleção de um novo teste, é importante levar-se em
32 consideração detalhes relevantes sobre o método mais adequado de acordo com o
33 total de amostras processadas diariamente ou ao nível de identificação requerido
34 (gênero ou espécie). A maioria desses métodos de detecção, tais como o meio de

cultivo seletivo mais usual, são incapazes de distinguir entre as espécies de *Listeria*. Entre o gênero *Listeria*, somente *L. monocytogenes* é um patógeno humano, necessitando do emprego de metodologias analíticas espécie-específicas para sua identificação. Além do mais, nem todas as cepas de *L. monocytogenes* são igualmente capazes de causar doença em humanos (McLauchlin, 1990; Farber and Peterkin, 1991). Dos 13 sorovares de *L. monocytogenes*, somente três (1/2a, 1/2b and 4b) causam mais de 90% dos casos em humanos (Gellin & Broome, 1989; Swaminathan, 2001). Uma técnica de multiplex-PCR foi desenvolvida para separar os quatro sorovares de *L. monocytogenes* mais prevalentes no isolamento de amostras alimentares e de pacientes (1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b) em diferentes grupos (Doumith *et al.*, 2004), o qual se constitui em uma alternativa prática e rápida para a laboriosa sorotipagem clássica. No futuro, métodos revolucionários como *microarrays*, provavelmente, permitirão o monitoramento da contaminação alimentar somente através dos subtipos virulentos de *L. monocytogenes*, prevenindo, então, a listeriose humana de origem alimentar (Call *et al.*, 2003a).

Esta revisão está dividida em três setores. O primeiro descreve a detecção padrão de *L. monocytogenes* em alimentos baseada nos métodos de cultivo. Na segunda etapa, testes rápidos baseados em métodos bioquímicos, imunológicos ou moleculares para a identificação desse patógeno são revisados. Finalmente, novos métodos que podem ser utilizados futuramente e diferentes perspectivas da detecção de *L. monocytogenes* são brevemente discutidos.

Métodos-padrão atuais

Isolamento

Métodos de referência quanto ao enriquecimento e ao cultivo em placas. De acordo com as principais agências reguladoras, os métodos de isolamento devem ser suficientemente capazes de detectar *Listeria* em 25g de alimento. Essa sensibilidade somente pode ser alcançada através do uso de métodos de enriquecimento. Esses métodos empregam agentes antimicrobianos que inibem especificamente a microbiota competitiva, antes do plaqueamento em ágar seletivos e cultivos confirmatórios. Os agentes seletivos normalmente utilizados em caldos de

1 enriquecimento são a acriflavina, a qual inibe o crescimento de outras bactérias
2 Gram-positivas; o ácido nalidíxico, que inibe bactérias Gram-negativas, e a
3 cicloheximida, que inibe o crescimento de fungos. Outros antimicrobianos
4 amplamente utilizados incluem o agente de amplo espectro ceftazidima e
5 moxalactam, assim com cloreto de lítio. Outra importante característica dos meios
6 de cultivo para o isolamento de *Listeria* é a inclusão da esculina. Toda *Listeria* spp.
7 hidrolisa a esculina, e a inclusão da esculina e íons de ferro no caldo de
8 enriquecimento ou no ágar, resultam na formação de uma coloração negra intensa
9 (Fraser and Sperber, 1988). Isso ocorre devido ao complexo formado entre o ferro e
10 a 6,7-dihidroxicumarina, o produto da quebra da esculina pela β -D-glucosidase,
11 resultado no precipitado enegrecido.

12 Muitos métodos convencionais para o isolamento de *Listeria* spp. proveniente de
13 alimentos têm ganhado aceitação para propósitos internacionais de regulamentação.
14 Dependendo da natureza da amostra, um método em particular pode ser mais
15 adequado do que outro. Em geral, as amostras de alimentos são homogeneizadas e
16 incubadas em caldos de pré-enriquecimento e de enriquecimento por 24-72 h a 30-
17 37°C (ISO, 1996; USDA, 2002a; Hitchins, 2003).

18 Os métodos de cultivo mais comumente utilizados para a detecção de *Listeria* em
19 alimentos, no mundo inteiro, são os métodos-padrão ISO 11290 (ISO, 1996; EC,
20 1999). Nos Estados Unidos da América (EUA) dois métodos-padrão principais são
21 utilizados como métodos de referência para o isolamento de *L. monocytogenes* em
22 alimentos. Um dos protocolos foi desenvolvido pela agência administradora de
23 medicamentos e alimentos no EUA (US Food and Drug Administration – FDA) para o
24 isolamento de *Listeria* spp. a partir de produtos lácteos, frutos-do-mar, e vegetais
25 (Hitchins, 2003). O Departamento de Agricultura dos EUA (US Department of
26 Agriculture - USDA) desenvolveu um outro método para isolar o microrganismo a
27 partir de carne e produtos de frango, assim como de amostras ambientais (USDA,
28 2002a).

29 Em todos os métodos de enriquecimento, outros grupos de *Listeria* podem
30 crescer mais rapidamente do que *L. monocytogenes*. Além disso, antes dos anos
31 “90”, todos os métodos comerciais disponíveis para o isolamento de *Listeria*
32 falhavam por não apresentar a habilidade de diferenciar *L. monocytogenes* de
33 espécies não-patogênicas. Mesmo com a seleção de várias colônias suspeitas,
34 poderia haver a indução da detecção de somente espécies não-patogênicas de

1 *Listeria*, embora poucas colônias de *L. monocytogenes* estivessem presentes na
2 placa. Portanto, o uso de meios de cultivo para o isolamento que permitem a
3 identificação de *L. monocytogenes* mesmo na presença de altos números de outras
4 espécies de *Listeria*, é recomendado.

5
6 **Meios de cultivo cromogênicos.** Diferentes meios de cultivo cromogênicos têm
7 sido desenvolvidos para gerenciar e identificar convenientemente *Listeria* spp.
8 patogênica e/ou *L. monocytogenes* (Tabela 2). Isso ocorre pela ação de enzimas
9 expressas pelo patógeno e pela produção de ácidos pela fermentação de açúcares.
10 Diferentes antimicrobianos são adicionados ao meio de cultivo para se obter
11 suficiente seletividade. Os meios de cultivo cromogênicos são os métodos de cultivo
12 confirmatórios mais utilizados por sua facilidade de preparo e interpretação. A
13 maioria deles está disponível comercialmente como placas prontas para o uso. A
14 utilização de ágar cromogênicos oferece a possibilidade de identificação
15 presuntiva de *L. monocytogenes* após 24 h, comparando-se com 3-4 dias quando
16 são utilizados ágar como o Oxford e outros (Greenwood *et al.*, 2005). A maioria
17 desses meios de cultivo foi testada em uma ampla gama de diferentes alimentos
18 (Reissbrodt, 2004), e atualmente estão incluídos em quase todos os protocolos e
19 metodologias-padrão (Hitchins, 2003; ISO, 2004).

20 O gene de virulência *plcA*, presente em *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L.*
21 *seeligeri*, que codifica a síntese da phosphatidylinositol-phospholipase C (PIPL-C)
22 (Gouin *et al.*, 1994) geralmente é utilizado para a identificação de *Listeria* hemolítica
23 e não-hemolítica (Notermans *et al.*, 1991). A clivagem da L- α -phosphatidylinositol
24 (PI) pela PI-PLC resulta na produção de ácidos-graxos insolúveis em água e na
25 formação de uma zona de precipitação visualizada pela formação halo opaco-
26 esbranquiçado ao redor das colônias das espécies hemolíticas. Ottaviani *et al.*
27 (1997) combinaram esse sistema de detecção com um substrato cromogênico (5-
28 bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside, X-gluc) para a detecção da atividade
29 da β -D-glucosidase. Nesse meio de cultivo, denominado “Agar *Listeria* according to
30 Ottaviani and Agosti” (ALOA), toda *Listeria* spp. produz colônias de coloração
31 turquesa, e as espécies patogênicas *L. monocytogenes* and *L. ivanovii*, são
32 visualizadas rodeadas com uma zona de precipitação distinta (Reissbrodt, 2004). A
33 composição do ALOA é pública (Hitchins, 2003; ISO, 2004) e pode ser preparada no

1 laboratório, entretanto, o preparo de um meio de cultivo com tantos componentes
2 diferentes torna-se difícil para ser padronizado (Reissbrodt, 2004). Além do mais,
3 pode ser adquirido como meio de cultivo desidratado, menos oneroso do que as
4 placas prontas para o uso, como a maioria dos outros meios cromogênicos para a
5 identificação de *Listeria* spp. patogênica.

6 Variações adicionais do ágar ALOA foram desenvolvidas e receberam nomes
7 comerciais diferentes tais como teste cromogênico BCM®, *Biosynth International*;
8 *CompassL.mono*®, *Biokar Diagnostics*; BBL® CHROMagar® *Listeria*, *Becton*
9 *Dickinson Diagnostics*; etc. (Tabela 2).

10 Um substrato diferente para a PI-PLC é o 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-myo-inositol-
11 1-phosphate (X-IP) que resulta no aparecimento de colônias bacterianas de cor azul
12 quando clivado pela enzima (Restaino *et al.*, 1999). As colônias não-hemolíticas de
13 *Listeria* apresentam-se com coloração branca. Rapid'L.mono® agar (Bio-Rad) está
14 baseado no X-IP para a identificação de *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* PI-PLC-
15 positiva, as quais podem ser diferenciadas pela incapacidade de *L. monocytogenes*
16 em metabolizar D-xylose, resultando na ausência da formação de halo amarelo ao
17 redor da colônia (Lauer *et al.*, 2005). A baixa taxa de detecção de outras espécies
18 que não *L. monocytogenes* em ágar Rapid'L.mono® é uma desvantagem desse
19 meio de cultivo (Greenwood *et al.*, 2005).

20 Para a enumeração de *L. monocytogenes*, a metodologia padrão ISO 11290, parte
21 2 (ISO, 1998) é empregada, assim como protocolos otimizados mencionados pela
22 FDA e os métodos indicados pelo USDA (USDA, 2002a; Hitchins, 2003). O caldo de
23 enriquecimento inicial pode então ser quantificado, antes de se iniciar a incubação,
24 pelo plaqueamento direto por espalhamento em meio de cultivo cromogênico;
25 porém, para contaminações com baixas concentrações microbianas, a quantificação
26 de *Listeria* tem sido tradicionalmente realizada pelo método do número mais
27 provável (NMP) (Hitchins, 2003). Essa técnica é mais sensível do que o
28 plaqueamento direto em ágar, porém são necessários 7 dias para a identificação
29 completa. Com o uso de meio de plaqueamento cromogênico após o enriquecimento
30 por NMP, *L. monocytogenes* pode ser enumerada diretamente. Em alguns meios
31 cromogênicos de plaqueamento, tais como o ALOA, a contagem é maior do que
32 aquelas observadas em ágares seletivos padrão para *Listeria* spp. (Vlaemynck *et al.*,
33 2000). Isso pode estar relacionado à habilidade do ALOA em recuperar células
34 injuriadas de *L. monocytogenes* (Jantzen *et al.*, 2006).

Confirmação

Os métodos de enriquecimento são seguidos pelo isolamento dos microrganismos enriquecidos em meio de plaqueamento específico, e a identificação ou confirmação da bactéria isolada. Portanto, as características bioquímicas e fenotípicas são os métodos mais comumente utilizados para a confirmação da espécie, requerendo mais de uma semana para completar o processo de identificação. Os métodos rápidos podem ser utilizados não somente para o monitoramento de amostras enriquecidas, mas também para confirmação de cultivos. (Figura 1).

O Gênero *Listeria*. De acordo com os agentes seletivos presentes no meio de cultivo utilizado para o isolamento de *Listeria* spp., outros microrganismos podem crescer e alguns destes também podem gerar colônias com morfologia que leve a erros no diagnóstico. Colônias suspeitas devem ser investigadas para as características típicas do gênero *Listeria* (por exemplo, bactérias Gram-positivas e não formadoras de esporos, catalase-positiva e oxidase-negativa, e motilidade a 28°C e não-motilidade a 37°C) (Ryser and Marth, 2004).

Diferenciação entre as espécies. A fermentação de diferentes açúcares produzindo ácido sem produção de gás permite a diferenciação das espécies de *Listeria* (Tabela 1; Hitchins, 2003). O uso de *kits* bioquímicos comerciais miniaturizados promove a identificação de isolados purificados em amostra de forma rápida (Tabela 2). Além disso, alguns desses *kits* foram intensamente avaliados e atualmente estão incorporados a metodologia padrão (USDA, 2002a; Hitchins, 2003), tais como API® *Listeria* (bio-Mérieux) e Micro-ID® (Organon Teknika) (Tabela 2).

Espécies patogênicas. Espécies patogênicas e não-patogênicas podem ser diferenciadas pela hemolisina ou pela atividade da PI-PLC. A hemólise é a chave para se distinguir as duas espécies frequentemente isoladas, como por exemplo *L. monocytogenes* (hemolítica) e *L. innocua* (não-hemolítica). A confirmação de espécies patogênicas de *Listeria* também pode estar baseada na sua atividade PI-PLC detectada pela maioria dos meios de cultivo cromogênicos (Tabelas 1 e 2). Os discos β -lysin, disponíveis comercialmente, são recomendados (Hitchins, 2003)

como um teste simples para diferenciar atividades hemolíticas de espécies de *Listeria* ao invés do tradicional teste CAMP (Christie-Atkins-Munch-Peterson) (Christie *et al.*, 1944; McKellar, 1994). A fermentação da D-xylose e da L-rhamnose também podem ser utilizadas para diferenciar *L. monocytogenes* (D-xylose-negativa e L-rhamnose-positiva) das outras duas espécies hemolíticas *L. ivanovii* e *L. seeligeri* (D-xylose-positiva e L-rhamnose-negativa) (Tabela 1). Alanil peptidase é uma enzima produzida por todas as espécies de *Listeria*, exceto *L. monocytogenes*. Os discos MonocytogenesID® (Biolife) utilizam uma reação simples de coloração, em que o substrato DL-alanina- β -naphthylamide e D-alanina-*p*-nitroanilide são hidrolisados (Clark e McLauchlin, 1997). Similarmente, no O.B.I.S.mono® (*Oxoid Biochemical Identification System*) é possível descartar, num curto período de 10min, colônias suspeitas que não sejam *Listeria monocytogenes*.

Métodos rápidos alternativos para o monitoramento de amostras enriquecidas e/ou confirmação de cultivos

A maioria dos métodos alternativos ainda falha quanto a suficiente sensibilidade e especificidade para as provas diretas, e as amostras de alimentos necessitam passar por um enriquecimento antes das análises (Feng, 2001a,b). Os métodos imunológicos apresentam limite de detecção relativamente alto (Tabela 3), enquanto que os métodos de amplificação dos ácidos nucleicos são bem mais sensíveis (teoricamente se detecta uma simples célula). Os métodos moleculares freqüentemente são inibidos por componentes da matriz alimentar e não são capazes de diferenciar as células vivas das mortas. Portanto, o enriquecimento é necessário a fim de se diluir os inibidores e certificar-se de que a detecção dos ácidos nucleicos dá-se em função das células viáveis.

Antes de se tomar uma decisão sobre a seleção de um novo teste, é importante analisar se tal teste foi validado e aprovado. As associações privadas de regulamentação de testes indicam que os fabricantes submetam os novos métodos para avaliação com o objetivo de adquirirem validação independente dos ensaios comerciais. Essa regulamentação ocorre no que diz respeito a padronização dos procedimentos, o que não significa que o método seja reconhecido e aprovado por agências oficiais dos governos.

1 A Organização Internacional para Padronização (International Organization for
2 Standardization - ISO) é uma organização que é reconhecida em todo o mundo para
3 a padronização de métodos de detecção para *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*
4 (ISO, 1996, 1998, 2004). A Associação Analítica de Químicos (Association of
5 Analytical Chemists AOAC), em Washington, é uma autoridade amplamente
6 reconhecida na validação de métodos. Os métodos oficiais AOAC (AOAC
7 International, 2000) incluem diferentes testes alternativos que passaram por
8 validações colaborativas e são indicados para serem utilizados em matrizes
9 alimentares específicas, de acordo com cada *kit* (Tabela 2). Alguns desses métodos
10 para o monitoramento de amostras enriquecidas também são citados pela FDA
11 (Hitchins, 2003).

13 **Métodos imunológicos**

15 Existem vários métodos baseados em anticorpos específicos para *Listeria*, que
16 estão disponíveis em *kits* comerciais, os quais têm sido utilizados em amostras de
17 alimentos por muitos anos. Entretanto, somente poucos deles estão disponíveis para
18 a detecção específica de *L. monocytogenes* (Tabela 2).

19 O ensaio imuno-enzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA) é o
20 teste de reação antígeno-anticorpo mais comumente utilizado para a detecção de
21 patógenos em alimentos. É de fácil manuseio, gera rápidos resultados e permite o
22 uso de matrizes alimentares mais complexas. O sucesso de um teste ELISA
23 depende da especificidade do anticorpo. O uso da tecnologia do hibridoma tem
24 permitido o desenvolvimento de anticorpos monoclonais que reagem somente com
25 *L. monocytogenes*.

26 Existe um teste que utiliza anticorpos monoclonais que reconhecem a proteína
27 p60 (proteína associada à invasão, codificada pelo gene *iap*) para a detecção de *L.*
28 *monocytogenes* (Ky *et al.*, 2004). Pela combinação de anticorpos monoclonais
29 reconhecidos por essa proteína, foi possível se desenvolver um ELISA que identifica
30 especificamente *L. monocytogenes* ou simplesmente detecta espécies de *Listeria*.
31 Outros testes semelhantes para a identificação ou confirmação também têm sido
32 levados ao mercado. Transia® Plate *Listeria monocytogenes* (Diffchamb AB) (Bubert
33 *et al.*, 1994) e VIDAS® LMO (bio-Mérieux) (Vaz-Velho *et al.*, 2000) são métodos

1 ELISA utilizados para se confirmar isolados de *Listeria* como sendo *L.*
2 *monocytogenes* (Table 2) (Hitchins, 2003).

3 Testes imunológicos para o monitoramento específico de *L. monocytogenes* em
4 enriquecimento não são comuns. A expressão de determinantes de virulência
5 dependentes de *prfA* em *L. monocytogenes* são termo-dependentes e são ativados
6 em um baixo nível no ambiente extracelular (Ripio *et al.*, 1996; Milenbachs *et al.*,
7 1997; Shetron-Rama *et al.*, 2003). Além disso, as reações com anticorpos têm-se
8 demonstrado significativamente reduzidas em patógenos expostos a fatores
9 adversos do meio-ambiente (Hahm & Bhunia, 2006). É por esse motivo que a
10 detecção baseada em anticorpos específicos para fatores de virulência de *L.*
11 *monocytogenes*, ao invés de *Listeria* spp., frequentemente demonstra-se
12 problemática.

13 Contudo, existe um teste comercial denominado VIDAS® LMO (bio-Mérieux), que
14 detecta apropriadamente um antígeno de virulência estável em um ensaio
15 fluorescente específico para *L. monocytogenes* com enzima ligada (enzyme-linked
16 fluorescent assay - ELFA) (Kerdahi & Istafanos, 2000; Vaz-Velho *et al.*, 2000). O
17 método VIDAS® LMO II foi validado em 2002 (USDA, 2002a) como um método
18 rápido para todas as amostras de produtos alimentares e de ambiente. Nesse teste,
19 dois anticorpos monoclonais complementares direcionados para diferentes sítios
20 antigênicos de uma proteína de virulência específica para *L. monocytogenes* são
21 utilizados para o processo de captura e detecção das proteínas. É um teste
22 qualitativo, porém quanto maior a quantidade de antígeno, maior a intensidade da
23 fluorescência capturada. Em um estudo multilaboratorial conduzido por Silbernagel
24 *et al.* (2004b), o imunoteste VIDAS® LMO II foi avaliado. Foram analisados cinco
25 tipos de alimentos em 3 níveis diferentes de contaminação, e foi demonstrado que a
26 partir de 1152 amostras testadas, 448 foram positivas pelo teste VIDAS® LMO II e
27 457 foram positivas pelo método de cultivo tradicional. Existe, também, um terceiro
28 método (VIDAS® *Listeria* DUO) para a detecção simultânea de *L. monocytogenes* e
29 *Listeria* spp. em produtos alimentares (bio-Mérieux).

30

31 **Métodos baseados no Ácido Nucléico**

32

33 A detecção de *L. monocytogenes* por métodos moleculares é muito específica, os
34 quais podem ser tão rápidos quanto os testes imunológicos.

Hibridização do DNA. Os testes de hibridização do DNA têm sido amplamente utilizados para a diferenciação de *L. monocytogenes* de outras espécies de *Listeria* por meio de técnicas direcionadas para genes específicos. Existem diferentes tipos de kits disponíveis para o teste de cultivos puros, bem como de alimentos e amostras ambientais (Tabela 2) (Feng, 2001a, b; Hitchins, 2003). O GeneTrak® e o GeneQuench® *Listeria monocytogenes* Test Kits (Neogen) são testes baseados na hibridização realizada em tubos-testes ou em placas de microtitulação, respectivamente. Eles podem ser utilizados para se confirmar isolados de *Listeria* como sendo *L. monocytogenes*, bem como para monitorar amostras de alimentos e de meio-ambiente (Baylis, 2000). O “AccuProbe® *Listeria monocytogenes* Culture Confirmation Test” (Gen-Probe), também é utilizado para a identificação de *L. monocytogenes* a partir de cultivos, e está baseado na hibridização do DNA para seqüências específicas do RNA ribossomal de *L. monocytogenes* (Ninet *et al.*, 1992; USDA, 2002a). Os híbridos DNA-RNA são mensurados em um aparelho que mede a luz. Ambos métodos de hibridização do DNA foram comparados por Duvall e Hitchins (1997).

PCR. O PCR é um método rápido e específico de amplificação do ácido nucléico, útil para a detecção de patógenos de origem alimentar. Um grande número de testes baseados em PCR tem sido descrito para a detecção de *L. monocytogenes* em alimentos (Levin, 2003). Os métodos baseados em PCR apresentam sensibilidade superior quando comparados a provas-padrão de ácidos nucléicos ou aos imunoensaios. Entretanto, os métodos de preparo de amostras complexas e o uso do ponto final de detecção através do gel de eletroforese impulsionaram a transição destes métodos da pesquisa para o uso rotineiro em laboratórios de microbiologia de alimentos. Contudo, os fatores que influenciam os resultados da PCR convencional em amostras de alimentos continuam sendo investigados (Aznar & Alarcón, 2003) e padronizados (D’Agostino *et al.*, 2004).

Na PCR em tempo real, a amplificação do DNA pode ser quantificada pela medição da fluorescência com relação à ligação de um agente cromogênico intercalante ou à ligação de uma prova de hibridização fluorescente. O aumento na fluorescência pode ser monitorado em tempo real, o que permite uma quantificação apurada sobre várias ordens de magnitude da seqüência-alvo de DNA ou de RNA. Os resultados podem ser obtidos em uma hora ou menos, o que é considerado mais

1 rápido do que o teste de PCR convencional. A sensibilidade e a especificidade da
2 PCR a tempo real é equivalente àsquelas da PCR convencional combinada com as
3 análises de *Southern blot*. O método elimina etapas de manipulação dos produtos de
4 PCR após a amplificação, reduzindo os riscos de se obter resultados falso-positivos
5 através da contaminação cruzada entre os produtos de amplificação e os testes
6 subsequentes das amostras (Norton, 2002). Todas essas características,
7 combinadas com sua conveniente aplicabilidade, têm feito da PCR em tempo real
8 uma alternativa aos métodos de detecção convencionais baseados no cultivo ou nos
9 imunoenaios (Norton, 2002).

10 Diferentes testes de PCR em tempo real para a detecção de *L. monocytogenes*
11 em alimentos foram descritos (Nogva *et al.*, 2000; Hough *et al.*, 2002; Koo e Jaykus,
12 2003; Rodriguez-Lázaro *et al.*, 2004a,b,c, 2005a,b; Rudi *et al.*, 2005; Berrada *et al.*,
13 2006; Oravcova *et al.*, 2006). A existência no comércio de *kits* e reagentes para PCR
14 em tempo real (Tabela 2) torna-o mais acessível para indústrias de alimentos
15 adaptarem esse teste a suas necessidades laboratoriais. Esses kits e reagentes
16 também facilitam o desenvolvimento de protocolos de testes padronizados e comuns
17 a outros estabelecimentos que propiciem estudos colaborativos apropriados
18 (Silbernagel *et al.*, 2004a). O USDA (2002b) adotou o sistema BAX® *L.*
19 *monocytogenes* (BAX® *L. monocytogenes* Detection System) (DuPont-Qualicon)
20 como um método de monitoramento para *L. monocytogenes* em amostras
21 enriquecidas de carne bovina e de frango. Isso reduz o tempo gasto para amostras
22 verdadeiramente negativas por 24 h, e reduz resultados falso-positivos, com um
23 limite de detecção de 1 célula.g⁻¹ em 25 g de amostra. Em um estudo colaborativo
24 para se comparar o sistema BAX® com os métodos-padrão de cultivo, concluiu-se
25 que, para os produtos cárneos e derivados lácteos testados, esses sistema de
26 detecção demonstrou ser tão bom ou melhor do que os métodos-padrão de
27 referência (Silbernagel *et al.*, 2004a).

28 Um outro *kit* baseado na PCR e comercialmente disponível, denominado
29 Probelia® (Bio-Rad), foi comparado ao método ISSO 11290-1 para a detecção de *L.*
30 *monocytogenes* em amostras de salmão por Wan *et al.* (2003). Os resultados
31 indicaram que o método PCR Probelia® é tão eficiente quanto o método ISO.

32 O *kit* para detecção *LightCycler® Listeria monocytogenes* (Roche/Biotecon)
33 (Junge & Berghof-Jager, 2006), o sistema de detecção *GeneVision® Rapid*
34 *Pathogen Detection System* para *Listeria monocytogenes* (Warnex) e o *kit* de

1 detecção TaqMan® *Listeria monocytogenes* (Applied Biosystems) são alguns dos
2 outros kits pra PCR que podem ser utilizados para detectar qualitativamente DNA de
3 *L. monocytogenes* em amostras de alimentos, crus ou não, submetidas a
4 enriquecimento (Tabela 2). A maioria desses kits fornece reagentes prontos para o
5 uso na detecção e amplificação, e um alvo-controle. Controles internos de
6 amplificação são usualmente adicionados para prevenir interpretações equivocadas
7 e resultados falso-negativos através da inibição de amplificações.

8 Normalmente, todos estes métodos comerciais são qualitativos, porém a aplicação
9 da PCR em tempo real como um método quantitativo de detecção, específico para *L.*
10 *monocytogenes*, também foi desenvolvido (Nogva *et al.*, 2000; Hough *et al.*, 2002;
11 Koo and Jaykus, 2003; Rodriguez-Lázaro *et al.*, 2004a,b,c, 2005a,b; Rudi *et al.*,
12 2005; Berrada *et al.*, 2006; Oravcova *et al.*, 2006) e isso demonstra um bom
13 potencial para uso na rotina de análises. Entretanto, a quantificação direta de *L.*
14 *monocytogenes* em alimentos por PCR é difícil porque o microrganismo geralmente
15 está presente em muito baixas concentrações. Por exemplo, em alimentos prontos
16 para o consumo e que são positivos para *L. monocytogenes*, Gombas *et al.* (2003)
17 encontraram 70% das amostras com níveis de $<0,3$ células (NMP).g⁻¹. Entretanto, o
18 enriquecimento de amostras ainda é necessário para se alcançar limite desejados
19 de detecção (Norton, 2002).

20 No entanto, os métodos de monitoramento baseados em PCR oferecem
21 resultados rápidos e confiáveis, e são ideais para se testar grandes quantidades de
22 amostras com grande probabilidade de apresentar resultado negativo para a
23 presença de *L. monocytogenes*. No futuro, métodos mais eficientes para a
24 purificação do DNA alvo, irão facilitar o aprimoramento dos testes quantitativos e a
25 detecção simultânea dos principais patógenos presentes em diferentes tipos de
26 alimentos através de PCR multiplex (Kawasaki *et al.*, 2005).

28 **Perspectivas futuras dos métodos de detecção para** 29 ***Listeria monocytogenes***

30
31 A geração de tecnologias tem avançado a grandes passos e pesquisas de ponta
32 para o monitoramento em tempo real, ou na linha de processamento de alimento,
33 para a investigação de múltiplos patógenos estão sendo desenvolvidas. O alvo da

análise deve ser encontrado na matriz alimentar antes mesmo de ser apresentado ao método de detecção. O cultivo do microrganismo na amostra pode não ser suficiente se a microbiota competidora crescer mais do que a bactéria-alvo, ou mesmo, se o microrganismo alvo está presente em baixos números e um pequeno volume de amostra é tomado (assim como em muitos métodos PCR somente 0,1 mL ou menos é necessário), há uma chance de que essa sub-amostra possa não incluir o organismo alvo.

Métodos de Pré-deteção para concentrar especificamente células de *Listeria monocytogenes*

O uso de esferas magnéticas sensibilizadas com anticorpo (*antibody-coated immunomagnetic beads*) para a captura de *Listeria* a partir de matrizes alimentares ou caldos de enriquecimento tem recebido considerável atenção (Jung *et al.*, 2003), as quais estão disponíveis em diferentes marcas (Paoli *et al.*, 2005). No futuro, métodos para concentrar especificamente *L. monocytogenes* provavelmente serão desenvolvidos. Por exemplo, um método rápido e sensível para a detecção direta de *L. monocytogenes* baseada na captura por hibridização magnética foi descrita, onde a amplificação do DNA purificado poderia identificar 10 células.mL⁻¹, sendo um nível de detecção mais sensível que um PCR realizado com ácidos nucleicos obtidos através de nanopartículas comerciais. O método evita pré-enriquecimentos e oferece uma alternativa rápida para os métodos microbiológicos convencionais de detecção (Amagliani *et al.*, 2006).

Testes que utilizam como alvo o RNA

Os métodos baseados em cultivos para o enriquecimento e enumeração de bactérias injuriadas ou estressadas durante o processamento dos alimentos não são precisos porque os meios seletivos empregados podem prevenir seu crescimento (Donnelly, 2002; Jantzen *et al.*, 2006). A fim de se monitorar a viabilidade bacteriana, os métodos baseados em RNA geralmente devem ser utilizados (Birch *et al.*, 2001). A diferenciação entre bactérias vivas e mortas por PCR convencional é difícil, pois o DNA persiste nas células mortas (Rudi *et al.*, 2005). A amplificação de mRNA de *L. monocytogenes* por transcrição reversa da PCR tem sido utilizada para se detectar especificamente bactérias viáveis contaminantes de carne (Klein & Juneja, 1997). Entretanto, sensibilidade e variação entre amostras dificultam o uso extensivo de

métodos baseados na identificação do RNA (Keer e Birch, 2003; Navas *et al.*, 2005). Técnicas específicas de amplificação de RNA têm sido desenvolvidas, incluindo a amplificação isotérmica baseada na sequência do ácido nucléico (*isothermal nucleic acid sequence-based amplification* - NASBA) (Compton, 1991; Cook, 2003), porém kits comerciais específicos para a detecção de RNA de *L. monocytogenes* em alimentos ainda não estão disponíveis.

Microsatélites ou biochips

A tecnologia dos microsensores de DNA abriu as portas para a detecção e a análise de forma paralela de centenas de seqüências gênicas em um relativo curto período de tempo, e poderia ser considerado um método rápido e preciso para se testar microrganismos comumente encontrados em alimentos. Os microsatélites de DNA compõem-se de várias sondas localizadas separadamente e de um substrato sólido visualizado em filmes de vidro modificados quimicamente. Essa sonda é complementar a uma seqüência gênica específica de um determinado patógeno. A prova de PCR é utilizada para amplificar um ou mais genes, e subsequente, os produtos são hibridizados ao alvo para identificar o polimorfismo espécie-específico em um ou mais genes. Essa tecnologia foi testada para a detecção de *L. monocytogenes* em amostras de meio-ambiente (Call *et al.*, 2003b). O microsensor do FDA foi desenvolvido para a detecção simultânea de vários patógenos de origem alimentar e seus fatores de virulência, entretanto apresenta grande potencial para ser utilizado pela indústria alimentícia.

Biosensores

Basicamente, um biosensor é uma molécula de origem biológica ancorada a um material que reconhece o sinal de ligação ao microrganismo. Quando a amostra entra em contato com o biosensor, a interação iniciará um sinal de reconhecimento que é reportada em um instrumento. O sinal de reconhecimento mais utilizado inclui transdutores eletroquímicos e óticos (UV, bioluminescência, fluorescência, etc).

Existe um exemplo de anticorpos policlonais e um novo teste de inibição do substrato que utiliza um biosensor BIAcore 3000, onde as células de *L. monocytogenes* e os anticorpos são incubados para permitir a detecção do microrganismo em menos de 30 min (Leonard *et al.*, 2004). O anticorpo livre é

passado sobre uma superfície imobilizada por um biochip sensor ligado a uma região anti-Fab com a resposta gerada sendo inversamente proporcional à concentração de células inibidas. Uma outra técnica desenvolvida é o Biosensor Multi-analítico (*Multi-Analyte Array Biosensor - MAAB*) com o objetivo de detectar e identificar simultaneamente múltiplos agentes-alvo em amostras complexas com o mínimo de manipulação (Taitt *et al.*, 2004). Os sensores microbianos são particularmente aplicáveis em sistemas fluidos com poucas substâncias orgânicas, porém essa técnica pode apresentar problemas na sua eficiência em alimentos contendo gorduras e proteínas que se ligam ao sensor e o deixa inapropriado para o teste (Montville and Matthews, 2005).

Conclusões

Os atuais métodos de referência para a detecção de *L. monocytogenes* permitem a recuperação do patógeno a partir de uma variedade de alimentos com relativa facilidade. A introdução de meios de cultivo cromogênicos aprimorou eficientemente o isolamento de *L. monocytogenes*. Os produtores e distribuidores de alimentos têm grande interesse em métodos mais rápidos, o que ajudou a trazer à tona as alterações desejadas na tecnologia oferecida atualmente. O principal objetivo no desenvolvimento de qualquer método alternativo dita que o teste deve ser rápido, simples, sensível, preciso e, para propósito comercial, ser de baixo custo. Quase todos os métodos alternativos são construídos para detectar um simples alvo, o que os torna ideais para o uso em programas de controle qualitativo para o monitoramento rápido de grandes números de amostras de alimentos. Um resultado positivo é considerado presuntivo e deve ser confirmado por métodos-padrão. Mesmo que vários estudos comparativos tenham sido relatados, nenhum esquema de detecção demonstra tanta superioridade a ponto de ser adotado universalmente. No entanto, os métodos de monitoramento baseados em PCR permitem a obtenção de resultados eficientes, confiáveis e são ideais para se monitorar a presença de *L. monocytogenes* em alimentos, oferecendo resultados em dois dias após a amostragem.

Agradecimentos

O trabalho de laboratório dos autores é financiado por Nutreco Servicios, S. A., e o Ministério da Educação da Espanha com os projetos CAL03-027-C2-1, PTR1995-0789-OP, e RTA2005-00202-C02-02, assim como bolsas de estudo do CNPq do Brasil (M.M. Jantzen) e do INIA da Espanha (J. Navas). Agradecemos os revisores por seus comentários e sugestões.

Referências Bibliográficas

- AMAGLIANI G., OMICCIOLI E., CAMPO A., BRUCE I.J., BRANDI G., MAGNANI M., 2006. Development of a magnetic capture hybridization-PCR assay for *Listeria monocytogenes* direct detection in milk samples. J Appl Microbiol 100, 375-383.
- AOAC INTERNATIONAL, 2000. Official methods of analysis of AOAC International. 17th edition. (W. Horwitz, ed.). Volume 1. Agricultural chemicals, contaminants and drugs. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- AZNAR R., ALARCÓN B., 2003. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. J Appl Microbiol 95, 958-966.
- BAYLIS C., 2000. The catalogue of rapid microbiological methods. Fourth edition. Review No. 1, Campden & Chorleywood Food Research Association, Chipping Campden, Gloucestershire, UK.
- BERRADA H., SORIANO J.M., PICO Y., MANES J., 2006. Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real time quantitative PCR. Int J Food Microbiol 107, 202-206.
- BIRCH L., DAWSON C.E., CORNETT J.H., KEER J.T., 2001. A comparison of nucleic acid amplification techniques for the assessment of bacterial viability. Lett Appl Microbiol 33, 296-301.
- BUBERT A., SCHUBERT P., KOHLER S., FRANK R., GOEBEL W., 1994. Synthetic peptides derived from the *Listeria monocytogenes* p60 protein as antigens for the generation of polyclonal antibodies specific for secreted cell-free *L. monocytogenes* p60 proteins. Appl Environ Microbiol 60, 3120-3127.
- CALL D.R., BORUCKI M.K., BESSER T.E., 2003a. Mixed-genome microarrays reveal multiple serotype and lineage-specific differences among strains of *Listeria monocytogenes*. J Clin Microbiol 41, 632-639.

- 1 CALL D.R., BORUCKI M.K., LOGE F.J., 2003b. Detection of bacterial pathogens in
2 environmental samples using DNA microarrays. J Microbiol Methods 53, 235-243.
- 3 CHRISTIE R., ATKINS N.E., MUNCH-PETERSEN E., 1944. A note on a lytic
4 phenomenon shown by group B streptococci. Aust J Exp Biol Med Sci 22, 197-
5 200.
- 6 CLARK A.G., MCLAUCHLIN J., 1997. Simple color tests based on an alanine
7 peptidase reaction which differentiate *Listeria monocytogenes* from other *Listeria*
8 species. J Clin Microbiol 35, 2155-2156.
- 9 COMPTON J., 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. Nature 350, 91-92.
- 10 COOK N., 2003. The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food
11 and environmental samples. J Microbiol Methods 53, 165-174.
- 12 D'AGOSTINO M., WAGNER M., VÁZQUEZ-BOLAND J.A., KUHTA T.,
13 KARPISKOVA R., HOORFAR J., NOVELLA S., SCORTTI M., ELLISON J.,
14 MURRAY A., FERNANDES I., KUHN M., PAZLAROVA J., HEUVELINK A.,
15 COOK N., 2004. A validated PCR-based method to detect *Listeria*
16 *monocytogenes* using raw milk as a food model--towards an international
17 standard. J Food Prot 67, 1646-1655.
- 18 DONNELLY C.W., 2002. Detection and isolation of *Listeria monocytogenes* from
19 food samples: implications of sublethal injury. J AOAC Int 85, 495-500.
- 20 DOUMITH M., BUCHRIESER C., GLASER P., JACQUET C., MARTIN P., 2004.
21 Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. J
22 Clin Microbiol 42, 3819-3822.
- 23 DUVAL R.E., HITCHINS A.D., 1997. Pooling of non-collaborative multilaboratory
24 data for evaluation of the use of DNA probe test kits in identifying *Listeria*
25 *monocytogenes* strains. J Food Prot 60, 995-997.
- 26 EC, 1999. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to
27 Public Health on *Listeria monocytogenes*. Brussels, Belgium: European
28 Commission. Health and Consumer Protection Directorate-General.
- 29 FARBER J.M., PETERKIN P.I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne
30 pathogen. Microbiol Rev 55, 476-511.
- 31 FENG P., 2001a. Development and impact of rapid methods for detection of
32 foodborne pathogens. In: Food microbiology. Fundamentals and frontiers (Doyle
33 M.P., Beuchat L.R., Montville T.J., eds.). ASM Press, Washington, D.C., USA, pp.
34 775-796.

- 1 FENG P., 2001b. Appendix 1, Rapid methods for detecting foodborne pathogens. US
2 Food and Drug Administration's Bacteriological Analytical Manual [on line].
3 Available in <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a1.html> [1 February, 2006].
- 4 FRASER J.A., SPERBER W.H., 1988. Rapid detection of *Listeria* spp. in food and
5 environmental samples by esculin hydrolysis. J Food Prot 51, 762-765.
- 6 GASANOV U., HUGHES D., HANSBRO P.M., 2005. Methods for the isolation and
7 identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. FEMS
8 Microbiol Rev 29, 851-875.
- 9 GELLIN B.G., BROOME C.V., 1989. Listeriosis. JAMA 261, 1313–1320.
- 10 GOMBAS D.E., CHEN Y., CLAVERO R.S., SCOTT V.N., 2003. Survey of *Listeria*
11 *monocytogenes* in ready-to-eat foods. J Food Prot 66, 559-569.
- 12 GOUIN E., MENGAUD J., COSSART P., 1994. The virulence gene cluster of *Listeria*
13 *monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and
14 *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. Infect Immun 62, 3550-3553.
- 15 GREENWOOD M., WILLIS C., DOSWELL P., ALLEN G., PATHAK K., 2005.
16 Evaluation of chromogenic media for the detection of *Listeria* species in food. J
17 Appl Microbiol 99, 1340-1345.
- 18 HAHM B.K., BHUNIA A.K., 2006. Effect of environmental stresses on antibody-based
19 detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serotype Enteritidis
20 and *Listeria monocytogenes*. J Appl Microbiol 100, 1017-1027.
- 21 HITCHINS A.D., 2003. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in
22 foods. US Food and Drug Administration's Bacteriological Analytical Manual.
23 Chapter 10 [on line]. Available in <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html> [1
24 February, 2006].
- 25 HOUGH A.J., HARBISON S.A., SAVILL M.G., MELTON L.D., FLETCHER G., 2002.
26 Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage
27 using real-time polymerase chain reaction. J Food Prot 65, 1329-1332.
- 28 ILSI RESEARCH FOUNDATION-RISK SCIENCE INSTITUTE, 2005. Achieving
29 continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis. A risk-based
30 approach. J Food Prot 68, 1932-1994.
- 31 ISO, 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the
32 detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method.
33 International Standard ISO 11290-1. International Organization for
34 Standardization. Geneva, Switzerland.

- 1 ISO, 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the
2 detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 2: Enumeration
3 method. International Standard ISO 11290–2. International Organization for
4 Standardization. Geneva, Switzerland.
- 5 ISO, 2004. Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion
6 of precision data. ISO 11290-1: 1996/ Amd 1: 2004. International Organization for
7 Standardization. Geneva, Switzerland.
- 8 JANTZEN M.M., NAVAS, J., DE PAZ M., RODRÍGUEZ B., DA SILVA W.P., NUÑEZ
9 M., MARTÍNEZ-SUÁREZ J.V., 2006. Evaluation of ALOA plating medium for its
10 suitability to recover high pressure-injured *Listeria monocytogenes* from ground
11 chicken meat. Lett Appl Microbiol 43, 313-317.
- 12 JUNG Y.S., FRANK J.F., BRACKETT R.E., 2003. Evaluation of antibodies for
13 immunomagnetic separation combined with flow cytometry detection of *Listeria*
14 *monocytogenes*. J Food Prot 66, 1283-1287.
- 15 JUNGE B., BERGHOF-JAGER K., 2006. Roche/Biotecon diagnostics lightcycler
16 foodproof *L. monocytogenes* detection kit in combination with shortprep foodproof
17 II kit. Performance-tested method 070401. J AOAC Int 89, 374-398.
- 18 KAWASAKI S., HORIKOSHI N., OKADA Y., TAKESHITA K., SAMESHIMA T.,
19 KAWAMOTO S., 2005. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella*
20 spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples. J
21 Food Prot 68, 551-556.
- 22 KEER J.T., BIRCH L., 2003. Molecular methods for the assessment of bacterial
23 viability. J Microbiol Methods 53, 175-183.
- 24 KERDAHI K.F., ISTAFANOS P.F., 2000. Rapid determination of *Listeria*
25 *monocytogenes* by automated enzyme-linked immunoassay and nonradioactive
26 DNA probe. J AOAC Int 83, 86-88.
- 27 KLEIN P.G., JUNEJA V.K., 1997. Sensitive detection of viable *Listeria*
28 *monocytogenes* by reverse transcription-PCR. Appl Environ Microbiol 63, 4441-
29 4448.
- 30 KOO K., JAYKUS L.A., 2003. Detection of *Listeria monocytogenes* from a model
31 food by fluorescence resonance energy transfer-based PCR with an asymmetric
32 fluorogenic probe set. Appl Environ Microbiol 69, 1082-1088.

- 1 KY Y.U., NOH Y., PARK H.J., LEE N., YOUN M., JUNG B.Y., YOUN B.S., 2004. Use
2 of monoclonal antibodies that recognize p60 for identification of *Listeria*
3 *monocytogenes*. Clin Diagn Lab Immunol 1, 446-4451.
- 4 LAUER W.F., FACON J.P., PATEL A., 2005. Evaluation of a chromogenic medium
5 for identification and differentiation of *Listeria monocytogenes* in selected foods. J
6 AOAC Int 88, 511-517.
- 7 LEONARD P., HEARTY S., QUINN J., O'KENNEDY R., 2004. A generic approach
8 for detection of whole *Listeria monocytogenes* cells in contaminated samples
9 using surface plasmon resonance. Biosens Bioelectron 19, 1331-1335.
- 10 LEVIN R.E., 2003. Application of the polymerase chain reaction for detection of
11 *Listeria monocytogenes* in foods: a review of methodology. Food Biotechnol 17,
12 99-116.
- 13 MCKELLAR R.C., 1994. Use of the CAMP test for identification of *Listeria*
14 *monocytogenes*. Appl Environ Microbiol 60, 4219-4225.
- 15 MCLAUCHLIN J., 1990. Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated
16 from different categories of patients with listeriosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis
17 9, 210-213.
- 18 MILENBACHS A.A., BROWN D.P., MOORS M., YOUNGMAN P., 1997. Carbon-
19 source regulation of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. Mol
20 Microbiol 23, 1075-1085.
- 21 MONTVILLE T.J., MATTHEWS K.R., 2005. Food microbiology: an introduction. ASM
22 Press. Washington, D.C., USA.
- 23 NAVAS J., ORTIZ S., MARTÍNEZ-SUÁREZ J.V., 2005. Simultaneous detection of
24 *Listeria monocytogenes* in chicken meat enrichments by PCR and reverse-
25 transcription PCR without DNA/RNA isolation. J Food Prot 68, 407-410.
- 26 NINET B., BANNERMAN E., BILLE J., 1992. Assessment of the Accuprobe *Listeria*
27 *monocytogenes* culture identification reagent kit for rapid colony confirmation and
28 its application in various enrichment broths. Appl Environ Microbiol 58, 4055-
29 4059.
- 30 NOGVA H.K., RUDI K., NATERSTAD K., HOLCK A., LILLEHAUG D., 2000.
31 Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria*
32 *monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk.
33 Appl Environ Microbiol 66, 4266-4271.

- 1 NORTON D.M., 2002. Polymerase chain reaction-based methods for detection of
2 *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental
3 samples. J AOAC Int 85, 505-515.
- 4 NOTERMANS S.H., DUFRENNE J., LEIMEISTER-WACHTER M., DOMANN E.,
5 CHAKRABORTY T., 1991. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity
6 as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria*
7 species. Appl Environ Microbiol 57, 2666-2670.
- 8 ORAVCOVA K., KACLIKOVA E., KRASCENICSOVA K., PANGALLO D., BREZNA
9 B., SIEKEL P., KUČHTA T., 2006. Detection and quantification of *Listeria*
10 *monocytogenes* by 5'-nuclease polymerase chain reaction targeting the *actA*
11 gene. Lett Appl Microbiol 42, 15-18.
- 12 OTTAVIANI F., OTTAVIANI M., AGOSTI M., 1997. Esperienza su un agar selettivo e
13 differenziale per *Listeria monocytogenes*. Ind Aliment 36, 1-3.
- 14 PAOLI G.C., BHUNIA A.K., BAYLES D.O., 2005. *Listeria monocytogenes*. In:
15 Foodborne pathogens, microbiology and molecular biology (Fratamico P.M.,
16 Bhunia A.K. & Smith J.L., ed.). Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk,
17 UK, pp. 295-325.
- 18 REISSBRODT R., 2004. New chromogenic plating media for detection and
19 enumeration of pathogenic *Listeria* spp.--an overview. Int J Food Microbiol 95, 1-
20 9.
- 21 RESTAINO L., FRAMPTON E.W., IRBE R.M., SPITZ H., SCHABERT G., 1999.
22 Isolation and detection of *Listeria monocytogenes* using fluorogenic and
23 chromogenic substrates for phosphatidylinositol-specific phospholipase C. J Food
24 Prot 62, 244-251.
- 25 RIJPENS N.P., HERMAN L.M., 2002. Molecular methods for identification and
26 detection of bacterial food pathogens. J AOAC Int 85, 984-995.
- 27 RIPIO M.T., DOMÍNGUEZ-BERNAL G., SUÁREZ M., BREHM K., BERCHE P.,
28 VÁZQUEZ-BOLAND J.A., 1996. Transcriptional activation of virulence genes in
29 wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the
30 extracellular medium composition. Res Microbiol 147, 371-384.
- 31 RODRÍGUEZ-LÁZARO D., HERNÁNDEZ M., PLA M., 2004a. Simultaneous
32 quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex
33 real-time PCR-based assay. FEMS Microbiol Lett 233, 257-267.

- 1 RODRÍGUEZ-LÁZARO D., HERNÁNDEZ M., SCORTTI M., ESTEVE T., VÁZQUEZ-
2 BOLAND J.A., PLA M., 2004b. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes*
3 and *Listeria innocua* by real-time PCR: assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483*
4 targets and AmpliFluor technology. Appl Environ Microbiol 70, 1366-1377.
- 5 RODRÍGUEZ-LÁZARO D., JOFRE A., AYMERICH T., HUGAS M., PLA M., 2004c.
6 Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real-
7 time PCR. Appl Environ Microbiol 70, 6299-6301.
- 8 RODRÍGUEZ-LÁZARO D., JOFRE A., AYMERICH T., GARRIGA M., PLA M., 2005a.
9 Rapid quantitative detection of, *Listeria monocytogenes* in salmon products:
10 evaluation of pre-real-time PCR strategies. J Food Prot 68, 1467-1471.
- 11 RODRÍGUEZ-LÁZARO D., PLA M., SCORTTI M., MONZO H.J., VÁZQUEZ-
12 BOLAND J.A., 2005b. A novel real-time PCR for *Listeria monocytogenes* that
13 monitors analytical performance via an internal amplification control. Appl Environ
14 Microbiol 71, 9008-9012.
- 15 RUDI K., NATERSTAD K., DROMTORP S.M., HOLO H., 2005. Detection of viable
16 and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. Lett
17 Appl Microbiol 40, 301-306.
- 18 RYSER E.T., MARTH E.H., 2004. *Listeria*, listeriosis and food safety. Third Edition.
19 Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- 20 SERGEEV N., DISTLER M., COURTNEY S., AL-KHALDI S.F., VOLOKHOV D.,
21 CHIZHIKOV V., RASOOLY A., 2004. Multipathogen oligonucleotide microarray
22 for environmental and biodefense applications. Biosens Bioelectron 20, 684-698.
- 23 SHETRON-RAMA L.M., MUELLER K., BRAVO J.M., BOUWER H.G., WAY S.S.,
24 FREITAG N.E., 2003. Isolation of *Listeria monocytogenes* mutants with high-
25 level in vitro expression of host cytosol-induced gene products. Mol Microbiol 48,
26 1537-1551.
- 27 SILBERNAGEL K., JECHOREK R., BARBOUR W.M., MROZINSKI P., ALEJO W.,
28 ALEO V., ANDALORO B., BEACORN F., BENZINGER J., BOGAR S., BRAYMAN
29 C., BROOM J., CARSON M., CARVER C., CHENG C., CENTRELLA B.,
30 CLAYBORN J., COLLINS C., DEIBEL C., DIVINE M., ELIASBERG S., FARMER
31 D., FRYE S., GATESY T., GOODSTEIN E., HALKER C., HALL G., HANSON P.,
32 HARTMAN G., HEDDAEUS K., HEMBREE J., HUTCHINS J., ISTAFANOS P.,
33 JECHOREK R., JENKINS J., KERDAHI K., KREMER S., LAL A., LEIGHTON S.,
34 LESTER D., LEWIS J., LIN J., MARTIN J., MASELLI M., MCCARTHY P.,

- 1 MCGOVERN B., MILLS M., MOHNKE F., MOON B., MOSS D., PLAZA M.,
2 ROBESON S., ROMERO H., RUBALCABA D., SCHULTZ A., SEEHUSEN J.,
3 SHAW C., SIEM K., SLOAN E., STANERSON J., STEPANOVA N., VAN K., VAN
4 ENKENVOORT K., VIALPANDO M., WARREN W., WATTS K., WILSON K.,
5 WOODRUFF T., 2004a. Evaluation of the BAX system for detection of *Listeria*
6 *monocytogenes* in foods: collaborative study. J AOAC Int 87, 395-410.
- 7 SILBERNAGEL K.M., CARVER C.N., JECHOREK R.P., JOHNSON R.L., 2004b.
8 Evaluation of VIDAS *Listeria monocytogenes* II (LMO2) immunoassay method for
9 the detection of *Listeria monocytogenes* in foods: collaborative study. J AOAC Int
10 87, 1123-1132.
- 11 SWAMINATHAN B., 2001. *Listeria monocytogenes*. In: Food microbiology:
12 fundamentals and frontiers (Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J., eds.). ASM
13 Press, Washington, DC, USA, pp. 383–409.
- 14 TAITT C.R., GOLDEN J.P., SHUBIN Y.S., SHRIVER-LAKE L.C., SAPSFORD K.E.,
15 RASOOLY A., LIGLER F.S., 2004. A portable array biosensor for detecting
16 multiple analytes in complex samples. Microb Ecol 47, 175-185.
- 17 USDA, 2002a. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat,
18 poultry, egg and environmental samples, revision 03, April 29, 2002. In:
19 Microbiology Laboratory Guidebook [on line]. Available in
20 <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microlab/mlgbook.htm>, MLG 8.03 pp 1–20 [1
21 February, 2006].
- 22 USDA, 2002b. Procedure for the use of *Listeria monocytogenes* BAX Screening
23 Test, effective April 29, 2002. In: Microbiology Laboratory Guidebook [on line].
24 Available in <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microlab/mlgbook.htm>, MLG 8A.00,
25 1–4 [1 February, 2006].
- 26 VAZ-VELHO M., DUARTE G., GIBBS P., 2000. Evaluation of mini-VIDAS rapid test
27 for detection of *Listeria monocytogenes* from production lines of fresh to cold-
28 smoked fish. J Microbiol Methods 40, 147-151.
- 29 VLAEMYNCK G., LAFARGE V., SCOTTER S., 2000. Improvement of the detection
30 of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic
31 isolation medium. J Appl Microbiol 88, 430-441.
- 32 WAN J., KING K., FORSYTH S., COVENTRY M.J., 2003. Detection of *Listeria*
33 *monocytogenes* in salmon using the Probelia polymerase chain reaction system.
34 J Food Prot 66, 436-440.

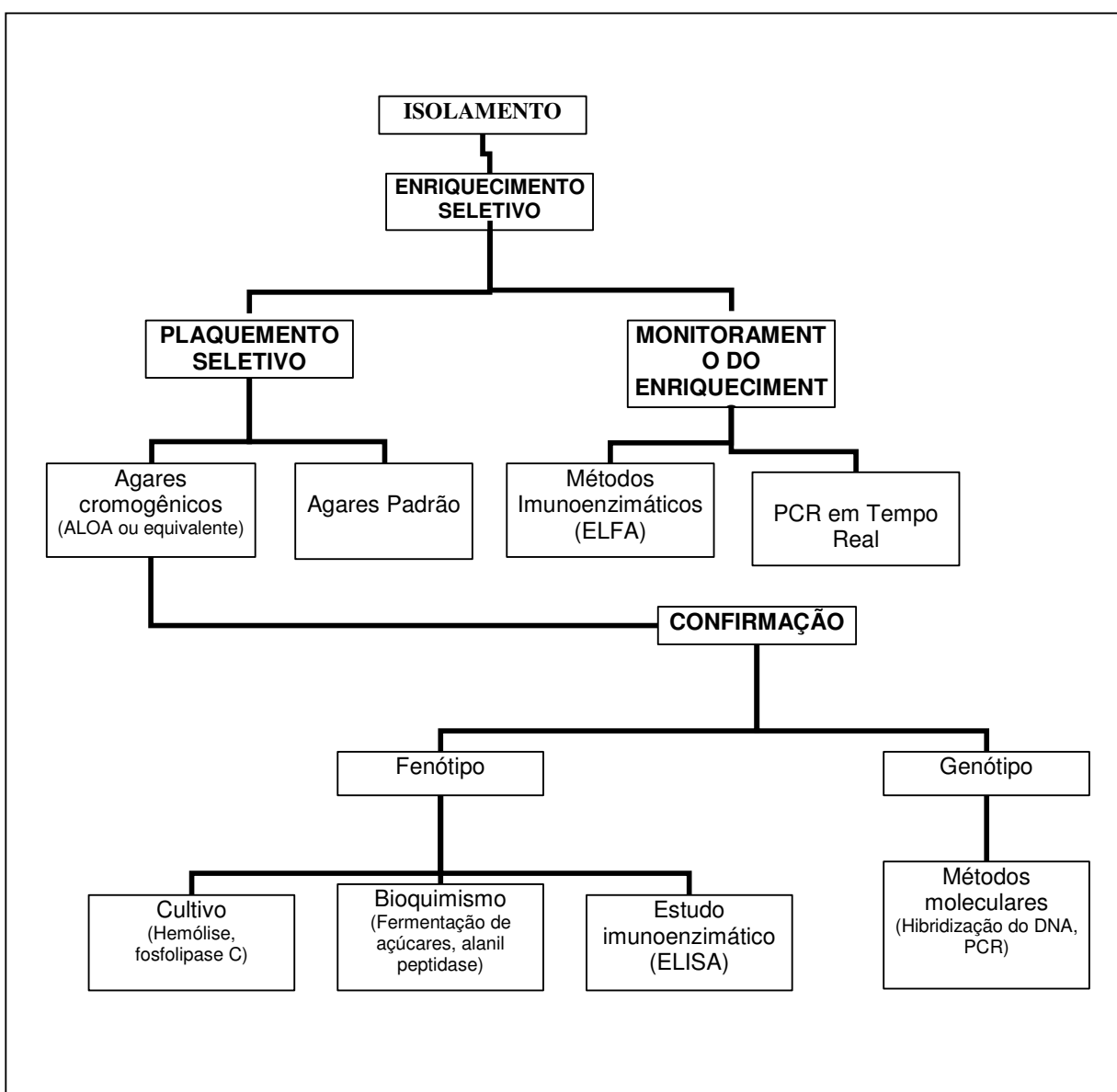


Figura 1. Visão geral dos métodos de detecção para *Listeria monocytogenes* em alimentos. Adaptado de Gasanov *et al.* (2005).

Tabela 1. Principais testes laboratoriais para a diferenciação de *Listeria monocytogenes*^a

Espécies	Hemólise ^b	Phosphatidylinositol phospholipase C ^c	Produção de ácido a partir de	
			L-Rhamnose	D-Xylose
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	+	-
<i>L. ivanovii</i>	+	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-	V ^d	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	V	+
<i>L. grayi</i>	-	-	V	-

^a Adaptado de Hitchins (2003) e Reisbrodt (2004). ^b Ágar sangue de ovelha ^c “Ágar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti” (ALOA) e meio de cultivo similar. ^d V, biótipos variáveis.

Tabela 2. Alguns métodos comerciais utilizados para a detecção ou identificação específica de *Listeria monocytogenes*^a

Tipo de método	Técnica Analítica ^b	Nome do Teste	Empresa
Cultivo	Meio Cromogênico	ALOA (also known under other names)	Várias empresas
Bioquímico	Meio Cromogênico	Rapid 'L.Mono®	Bio-Rad
	Testes bioquímicos	API® <i>Listeria</i>	bio-Mérieux
	Testes bioquímicos	Vitek® System	bio-Mérieux
	Reações Enzimáticas	MICRO-ID® <i>Listeria</i>	Organon Teknika
	Substratos de fonte de Carbono	MicroLog® System	Biolog
	Uso do carboidrato e teste de microhemólise	MICROBACT® 12L	Microgen
	Padrões de acidificação de gordura	Sherlock® Microbial Identification System	Microbial ID
Imunoensaio	ELFA	VIDAS® LMO	bio-Mérieux
Molecular	ELISA	Transia® Plate <i>Listeria monocytogenes</i>	Diffchamb
	Prova de hibridização do ácido nucléico	Gene Trak® e GeneQuench® <i>Listeria monocytogenes</i> Assays	Neogen
	Prova de hibridização do ácido nucléico	AccuProbe® <i>Listeria monocytogenes</i>	Gen-Probe
	PCR em tempo real	BAX® <i>L. monocytogenes</i> Detection System	DuPont-Qualicon
	PCR em tempo real	Probelia® <i>Listeria monocytogenes</i> PCR System	Bio-Rad
	PCR em tempo real	LightCycler® <i>Listeria monocytogenes</i> Detection kit	Roche/Biotecon
	PCR em tempo real	TaqMan® <i>Listeria monocytogenes</i> Detection Kit	Applied Biosystems
	PCR em tempo real	GeneVision® Rapid Pathogen Detection System for <i>Listeria monocytogenes</i>	Warnex

^a Adaptado da AOAC Internacional (2000), USDA (2002a,b), Hitchins (2003), Ryser e Marth (2004), e Gasanov *et al.* (2005). ^b ELFA, enzyme-linked fluorescent assay; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; PCR, polymerase chain reaction.

Tabela 3. Comparação dos métodos comerciais para avaliação de *Listeria monocytogenes*^a em alimentos

Tipo do método	Técnica Analítica ^b	Tempo aproximado (h) ^c	Principai uso ^d e tipo de amostras	Sensibilidade ^e (célula.mL ⁻¹)
Cultivo	Meio cromogênico	24-48	Isolamento, alimentos	≤10⁴
Imunoensaio	ELFA	1-2	Monitoramento, alimentos	≥10⁵
Molecular	Prova de hibridização do ácido nucléico	2-4	Monitoramento, alimentos e amostras ambientais	≥10⁷
	PCR em tempo real	≥2	Monitoramento, alimentos	≥10⁵

^a Adaptado de Gasanov *et al.*, 2005. ^b ELFA, *enzyme-linked fluorescent assay*; PCR, *polymerase chain reaction*. ^c Excluindo-se tempo de enriquecimento. ^d Os testes de monitoramento estão em vários estágios de validação e de aprovação regulamentar, e quando devidamente validados, eles poderão ser utilizados para o monitoramento de enriquecimentos de *L. monocytogenes*. ^e Sensibilidade do teste por mL de amostra enriquecida. Todos os testes aprovados são esperados que detectem 1 célula por 25g de amostra de alimento; portanto, todos os testes requerem um cultivo de enriquecimento por 24-48 h. A sensibilidade da PCR com cultivos puros não é aplicada para testes em alimentos.

**3 ARTIGO 2: Avaliação do Ágar ALOA quanto sua capacidade em recuperar
Listeria monocytogenes injuriada por altas pressões em carne de frango**

ABSTRACT

Aims: To evaluate a chromogenic plating medium for the isolation of sublethally injured cells of *Listeria monocytogenes* from processed foods.

Methods and Results: The inactivation of *Listeria monocytogenes* EGD-e at 12°C and pressures up to 400 MPa and 12°C in ground chicken meat was employed to examine the recovery of high-pressure injured cells. Before and after different repair incubation periods at 30°C in a non selective broth, samples were plated into a selective and differential agar [Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA)] and in the same medium supplemented with 4% sodium chloride (ALOA-S), and incubated at 37°C. Sublethally injured cells were able to grow when directly plated onto the ALOA medium, without a previous repair incubation period. However, only uninjured cells grew on the ALOA-S medium.

Conclusions: Sublethally injured cells of *L. monocytogenes* can be quantified by subtracting counts on ALOA-S medium from counts on ALOA medium.

Significance and Impact of Study: Possible applications include direct enumeration on ALOA of stressed cells of *L. monocytogenes* in foods with more than 100 colony forming units per gram.

Keywords: agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti, chicken meat, high-pressure, injured cells, *Listeria*

RESUMO

Objetivos: Avaliar um método cromogênico quantitativo para o isolamento de células de *Listeria monocytogenes* injuriadas subletalmente a partir de alimentos processados.

Métodos e Resultados: A inativação de *Listeria monocytogenes* EGD-e em pressões acima de 400 MPa e 12⁰C em carne de frango foi estudada para verificar o impacto do tratamento por altas pressões na recuperação de bactérias injuriadas a partir de matriz alimentar. Antes e após diferentes períodos de incubação a 30⁰C em meio não-seletivo, as amostras foram plaqueadas em um Ágar seletivo diferencial [*Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti* (ALOA)] e no mesmo Ágar suplementado com 4% de Cloreto de Sódio (ALOA-S), e incubadas a 37⁰C. As células injuriadas subletalmente foram capazes de crescer quando plaqueadas diretamente no Ágar ALOA, sem um período de recuperação prévio. Entretanto, somente as células não-injuriadas cresceram no Agar ALOA-S.

Conclusões: As células de *Listeria monocytogenes* injuriadas subletalmente podem ser quantificadas pela diferença na contagem entre as placas de ALOA e de ALOA-S .

Significância e impacto do estudo: Possíveis aplicações incluem enumeração direta em ALOA de mais de 100 UFC.g⁻¹ de células injuriadas de *L. monocytogenes*.

Palavras-chave: *Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti*, carne de frango, altas pressões, células injuriadas, *Listeria*.

INTRODUÇÃO

A detecção de células viáveis de patógenos bacterianos que podem estar injuriados após o processamento dos alimentos é essencial para a segurança alimentar (Ryser e Marth, 1999). A maioria dos meios de cultivo recomendados para o isolamento de *L. monocytogenes* injuriada subletalmente não possui nenhum grau de seletividade pois os agentes seletivos inibem a recuperação das células injuriadas (Donnelly, 2002). Poucas tentativas foram realizadas para desenvolver meios seletivos e diferenciais para o isolamento de células de *Listeria* injuriada subletalmente a partir de alimentos contaminados (Kang e Fung, 1999; Wu et al., 2001). A sobrecapa ou subcapa de ágar de meios não-seletivos para a detecção de células de patógenos de origem alimentar injuriadas subletalmente (Kang e Siragusa, 1999) apresentam limitações, as quais incluem a dificuldade de selecionar colônias devidamente isoladas a partir da subcapa de ágar, assim como a desigualdade entre a morfologia das colônias e a reação de coloração das colônias formadas na parte de baixo da sobrecapa e as formadas na superfície do ágar. Métodos mais simples e mais efetivos para a recuperação de patógenos de origem alimentar submetidos a estresse, a partir de alimentos contaminados, são necessários. Tais métodos podem ser baseados na escolha apropriada de agentes seletivos, em razão de que se sabe que o grau em que um dado agente seletivo inibe a recuperação de células de *Listeria* injuriada subletalmente é variável (Smith e Archer, 1988). Além disso, os agentes seletivos deveriam ser diferenciais para *L. monocytogenes* ou *Listeria* spp. patogênica.

O *Agar Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA), desenvolvido primeiramente como um meio seletivo e diferencial para *L. monocytogenes* (Ottaviani et al., 1997), tem apresentado uma eficiente recuperação de células de *Listeria* injuriadas

subletalmente (Vlaemynck et al., 2000). Nas placas de ALOA todas as *Listeria* spp. produzem colônias de coloração turquesa, e *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* aparecem rodeadas por uma zona de precipitação visualizada com um halo opaco diferencial (Reissbrodt, 2004). Esse e outro ágar cromogênico que permite realizar contagem direta de *Listeria* spp. patogênica são, atualmente, recomendados na maioria dos protocolos (Reissbrodt, 2004).

O objetivo do presente trabalho foi pesquisar um novo método para quantificar *L. monocytogenes* injuriada subletalmente em carne de frango. A recuperação das células durante a incubação em caldo não-seletivo foi analisada pela técnica de plaqueamento diferencial (Beuchat et al., 1986; Smith e Archer, 1988) com ALOA representando o ágar não-seletivo, e ALOA suplementado com 4 % de NaCl (ALOA-S), como o meio seletivo para células não injuriadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepa bacteriana, meios de cultivo, e condições de crescimento

L. monocytogenes EGD-e, uma cepa do sorotipo 1/2a obtida do projeto sequenciamento genômico de *L. monocytogenes* (Glaser et al., 2001), foi gentilmente cedida pelo Dr. Pérez-Días (Hospital Ramón y Cajal, Madri), e foi mantida em 15% de glicerol a -20°C. Um cultivo congelado foi transferido duas vezes repetidas em 3 mL de Caldo de Soja Triptona com Extrato de Levedura (TSYEB) seguido de incubação a 30°C por 18h antes de cada experimento. A recuperação das células foi realizada com caldo UVM base (*University of Vermont Broth* modificado, sem suplemento antimicrobiano). Para determinar o número de células, os cultivos ou enriquecimentos foram diluídos em série (1:10) em 0,1% (p/vol) peptona em água, e porções duplicadas de 0,1 mL de cada diluição foram plaqueadas na superfície do Agar ALOA e do ALAO-S no caso de *Listeria*, ou em ágar Soja triptona com Extrato de levedura (TSYEA) no caso de contagem de mesófilos aeróbios. Todos os meios de cultivo foram obtidos do Biolife Laboratories (Milan, Itália), exceto o ALOA (Cromogen *Listeria*) que foi obtido como meio desidratado (com suplementos seletivo e de enriquecimento separados), da Biomedics (Madri, Espanha). O ágar ALOA foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram examinadas após 24, 48 e 72 h de incubação aeróbia a 37°C para observação de contagem das UFC, tamanho das colônias, e coloração e formação do halo. Maiores tempos de incubação foram necessários de acordo com a injúria celular (48 h) ou o efeito do NaCl (72 h).

Preparo da carne moída de frango

Carne moída de frango foi utilizada como modelo de matriz alimentar altamente contaminada. Carne comercial moída foi comparada a carne moída artificialmente contaminada no laboratório, com peito de frango cru obtido no comércio local.

Porções de aproximadamente 800g foram moídas com um moedor doméstico por 10s, e porções individuais de 250g foram assepticamente pesadas em sacos plásticos estéreis, e congelados a -20°C por no máximo dois meses. Foram utilizadas subamostras de 25g que foram negativas para *Listeria* pelo procedimento USDA-FSIS (http://fsis.usda.gov/Ophs/Microlab/Mig_8_4.pdf, acessado em 10/03/05)

Inoculação e embalagem a vácuo das amostras de frango

As amostras de frango (250g) foram mantidas a 4°C por 24h antes de serem inoculadas. As células de *L. monocytogenes* foram concentradas por centrifugação ($10.000 \times g$, 10 min, 4°C), lavadas duas vezes com água peptonada, e diluídas em série no mesmo diluente para uma concentração (10^7 UFC.mL^{-1}) que chegasse a aproximadamente 10^5 UFC.g^{-1} na carne de frango. Cada porção de amostra de carne de frango foi inoculada com 2,5mL de diluição de cultivo de *L. monocytogenes* e homogeneizada manualmente, por aproximadamente 1min.

Subamostras de 25g de carne de frango moída e inoculada foram aliquotadas em embalagem a vácuo e mantidas a 4°C .

Tratamento com altas pressões

As amostras de frango inoculadas (4°C) foram tratadas nas dependências do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do *Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Agraria y Alimentaria* (INIA), que possui um processador hidrostático para

alimentos (ACB, Nantes, France). Para testar o poder de injúria subletal das altas pressões sobre *L. monocytogenes* em carne de frango, a cinética de inativação sob diferentes condições e em diferentes tipos de amostras foram examinadas. As amostras foram tratadas a partir de 200 a 400 Mega Pascal (MPa) a uma temperatura constante de 12⁰C por 2 a 15 min e a pressão mais alta foi estabelecida para ser utilizada. As amostras foram mantidas a 4⁰C por menos de 1h até serem analisadas.

Análises Microbiológicas

Cada pacote com amostras tratadas por altas pressões e amostras-controle não tratadas foram assepticamente abertos e as amostras foram transferidas para sacos *stomacher*. O caldo UVM base foi adicionado em cada uma das amostras de carne seguido de homogeneização por dois minutos em um homogeneizador laboratorial (Tekmar 400). Antes e após os diferentes períodos de incubação (3,6,9 e 24 h) a 30⁰C para a recuperação celular, *L. monocytogenes* foi enumerada em duplicata em ágar ALOA em ágar ALOA-S. As colônias típicas de *L. monocytogenes* em ALOA foram contadas após 48h (ALOA) ou após 72h (ALOA-S), a 37⁰C. Do grupo controle foram coletadas amostras para o cultivo em placas TSYEA a fim de se enumerar a microbiota acompanhante através da contagem de Mesófilos Aeróbios facultativos, antes e após 6 hora de incubação em UVM base.

Análise de Dados

Para comparar a recuperação de *L. monocytogenes* em ALOA ou em ALOA-S após 0 e 6 horas, a média da população celular de três ensaios foram gravados e convertidos em

valores logarítmicos ($\log_{10}$) para determinar a diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste T-Student.

RESULTADOS

Inativação induzida de *L. monocytogenes* por altas pressões

Pressões <400 MPa apresentaram baixo efeito sobre a inativação de *L. monocytogenes*. A fim de se alcançar >99% de injúria na população de *L. monocytogenes*, era necessário uma inativação logarítmica de mais de 2 ciclos ($\log_{10}$). Entretanto, de acordo com as diferenças na composição das amostras, em carne comercial (78% de carne de frango e 22% de gordura) e amostras puras de carne de frango moída, os tempos de inativação foram diferentes. A 400 MPa e 12°C houve uma inativação de 1 ciclo logarítmico a cada 3,29min (valor *D*) com a amostra de carne comercial, e a cada 1,41min com a carne pura de frango (dados não mostrados). O resultado obtido com o número de bactérias sobreviventes demonstrou uma característica de comportamento de morte de primeira instância com tratamentos curtos, os quais permitiram o cálculo do valor *D*. Após 3,5 min de tratamento, a pressão sob essas condições geralmente foi suficiente para alcançar uma inativação logarítmica de >2 $\log_{10}$ na carne pura moída de frango (Figura 1). Para uma melhor repetibilidade, os experimentos subseqüentes foram desenvolvidos com a carne pura moída de frango.

Crescimento da microbiota acompanhante e de *L. monocytogenes* em ALOA

O número de células nos caldos de enriquecimento contendo a carne de frango não-tratada aumentou mais do que 1 $\log_{10}$ em 6h de incubação, entretanto, nas amostras tratadas não houve aumento no número de sobreviventes antes de 6h. As contagens de Mesófilos Aeróbios Facultativos em TSYEA, revelou que a microbiota inicial variava de 2×10^3 a 1×10^4 UFC.mL⁻¹ e após 6 horas de incubação em UVM base esse número aumentava para 10^6 UFM.mL⁻¹ até 10^7 UFC.mL⁻¹. No caso de amostras tratadas, o ALOA recuperou o mesmo número de células as 0h e após 6h de enriquecimento não-seletivo (Tabela 1 e figura 1). Se as células injuriadas não crescessem em ALOA, como na maioria dos meios seletivos, o número de colônias em ALOA aumentaria durante o enriquecimento em razão do reparo da injúria. Concluiu-se que o ALOA permitiu a recuperação da maioria das células bacterianas injuriadas apesar de seu suplemento seletivo.

Crescimento de *L. monocytogenes* em ALOA-S comparado ao ALOA

Nas amostras não tratadas, a diferença na recuperação de *L. monocytogenes* em ALOA, e em ALOA-S, não foi significativa ($P>0,05$), porém em amostras tratadas, a recuperação de *L. monocytogenes* em ALOA foi significantivamente mais alta do que em ALOA-S ($P<0,05$). Assim como na curva típica de recuperação (Doyle et al., 2001; Ngutter e Donnelly, 2003), durante o tratamento, o decréscimo em UFC em ALOA representa a mortalidade, e a diferença entre os valores obtidos no ALOA e no ALOA-S representam a injúria (Figura 1). A recuperação de células injuriadas em ALOA-S variou de acordo com o tempo de incubação a 30°C em caldo não-seletivo, em função do tempo de recuperação. Antes da incubação no caldo (tempo zero), mais de 99% das

células estavam injuriadas e não cresceram em ALOA-S; durante a recuperação (amostras de 3 e 6h), as UFC obtidas em ALOA-S alcançaram as obtidas em ALOA e, após 9 h, foram similares (Figura 1).

DISCUSSÃO

A diferenciação de células viáveis e não viáveis é um desafio primordial em programas de segurança dos alimentos. As técnicas baseadas na amplificação de ácidos nucleicos podem distinguir microrganismos vivos e mortos (Navas et al., 2005; Rudi et al. 2005), porém, a detecção das células injuriadas e viáveis somente pode ser obtida se estas apresentarem capacidade para recuperação em meio de cultivo apropriado (Donnelly, 2002). Como a maioria das pesquisas publicadas que abordam o reparo de injúria celular emprega meios de cultivo ou diferentes sistemas de crescimento em caldo com pH tamponado (*buffer*) (Smith e Archer 1988; Ryser and Marth 1999; Donnelly 2002), neste trabalho objetivou-se testar a eficácia de caldos de enriquecimento não-seletivos a partir de amostra de frango com altas contagens de mesófilos aeróbios, para restabelecer *L. monocytogenes* subletalmente injuriada. Quando foi avaliada a eficiência do ALOA para células injuriadas, tanto as células não-injuriadas quanto as injuriadas foram capazes de crescer nesse ágar.

Para estimar o número total de células viáveis e a proporção da população celular que estava subletalmente injuriada por diferentes agentes estressantes, diferentes métodos de plaqueamento (Beuchat et al. 1986; Smith e Archer, 1988) foram empregados. Brevemente, estes métodos são baseados na observação de que tanto células de *L. monocytogenes* íntegras quanto as subletalmente injuriadas podem formar

colônias em meio de cultivo não-seletivo, porém as células injuriadas não produzem colônias no meio de cultivo contendo 4% de NaCl (Beuchat et al. 1986; Smith e Archer, 1988). Farkas et al. (2003) demonstraram que *L. monocytogenes* injuriada por altas pressões apresentou um aumento de sensibilidade ao sal. Ao suplementarem ágar BHI com 5% de NaCl, Farkas et al. (2003) observaram que não houve influência na recuperação de células não-pressurizadas, porém populações residuais de células tratadas foram reduzidas em vários ciclos logarítmicos quando o meio de cultivo utilizado continha NaCl.

No presente trabalho foi demonstrado que o ALOA e o ALOA-S podem ser utilizados como meio de plaqueamento diferencial para a enumeração de células injuriadas de *Listeria* a partir de alimentos processados. ALOA é um eficiente meio para a recuperação e subsequente seleção de cultivos de microrganismos subletalmente injuriados. A habilidade do ALOA para recuperar eficientemente *L. monocytogenes* não injuriada e injuriada subletalmente pode ser muito útil para a enumeração direta de células submetidas a estresse em certos tipos de alimentos processados e contendo um nível de contaminação por *Listeria* acima da sensibilidade da técnica de plaqueamento direto ($>100 \text{ UFC.g}^{-1}$). Utilizando-se o ALOA como ágar seletivo em um alimento altamente contaminado (amostras de frango não-tratadas) não observou-se diferença na morfologia da colônia e na seletividade para diferenciar *L. monocytogenes* a partir de uma matriz contendo diferentes organismos.

Além do mais, a composição do ALOA é pública (<<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/m10a.html>>, acesso em 10/03/05), podendo ser preparado no laboratório, embora a formulação do meio de cultivo com tantos componentes diferentes seja difícil para padronizar (Reissbrodt 2004). Entretanto, pode

ser adquirido como meio de cultivo desidratado, menos dispendioso do que as placas de Petri prontas para serem utilizadas (ou garrafas) ou do que a maioria dos meios cromogênicos para *Listeria* spp. patogênica.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi financiada pelo Ministério da Educação sob projetos protocolados Grants RTA02-034, CAL03-027-C2-1 and PTR1995-0789-OP, e bolsas de estudo do CNPq do Brasil (Márcia M. Jantzen) e INIA da Espanha (Jaime Navas F.). Os autores agradecem à S. Ortiz e P. Lopez pela assistência técnica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beuchat L.R., Brackett, R.E., Hao, D.Y., Conner, D.E. (1986) Growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in cabbage and cabbage juice. *Can J Microbiol* **32**, 791-795.
- Donnelly, C.W. (2002) Detection and isolation of *Listeria monocytogenes* from food samples: implications of sublethal injury. *J AOAC Int* **85**, 495-500.
- Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. (2001) *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 2nd edn., ASM Press, Washington, D.C.
- Farkas, J., Andrassy, E., Meszaros, L. and Simon, A. (2003) Increased salt- and nisin-sensitivity of pressure-injured bioluminescent *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiol Immunol Hung* **50**, 331-337.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C. et al. (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**, 849-852.
- Kang, D.H. and Fung, D.Y. (1999) Thin agar layer method for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* **62**, 1346-1349.

- Kang, D.H. and Siragusa, G.R. (1999) Agar underlay method for recovery of sublethally heat-injured bacteria. *Appl Environ Microbiol* **65**, 5334-5337.
- Navas, J., Ortiz, S. and Martinez-Suarez, J.V. (2005) Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* in chicken meat enrichments by PCR and reverse-transcription PCR without DNA/RNA Isolation. *J Food Prot* **68**, 407–410.
- Ngutter, C. and Donnelly, C. (2003) Nitrite-induced injury of *Listeria monocytogenes* and the effect of selective versus nonselective recovery procedures on its isolation from frankfurters. *J Food Prot* **66**, 2252-2257.
- Ottaviani, F., Ottaviani, M. and Agosti, M. (1997) Esperienza su un agar selettivo e differenziale per *Listeria monocytogenes*. *Ind. Aliment.* **36**: 888-8951.
- Reissbrodt, R. (2004) New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp.--an overview. *Int J Food Microbiol* **95**, 1-9.
- Rudi, K., Naterstad, K., Dromtorp, S.M., Holo, H. (2005) Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* **40**, 301-306.
- Ryser, E.T. and Marth, E.H. (1999) *Listeria, listeriosis and food safety*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Smith, I.L., Archer, D.L. (1988) Heat-induced injury in *Listeria monocytogenes*. *J Ind Microbiol.* **3**, 105-110.
- Vlaemynck, G., Lafarge, V. and Scotter, S. (2000) Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. *J Appl Microbiol* **88**, 430-441.

Wu, V.C., Fung, D.Y., Kang, D.H. and Thompson, L.K. (2001) Evaluation of thin agar layer method for recovery of acid-injured foodborne pathogens. *J Food Prot* **64**, 1067-1071.

TABELA 1: Recuperação de *Listeria monocytogenes* a partir de amostras tratadas e controles não-tratados com dois meios de cultivo, antes e após 6h de enriquecimento.

Amostras	$\log_{10}$ UFCU ml ⁻¹ *			
	0 h		6 h	
	ALOA	ALOA-S	ALOA	ALOA-S
Não-Tratadas	4,93 ± 0,31b	4,80 ± 0,32b	6,59 ± 0,22a	6,24 ± 0,22a
Tratadas	3,62 ± 0,60c	0.00e	3,85 ± 0,62c	2,58 ± 0,39d

* Os dados representam a média ± SD de três medidas antes ou após o tratamento (400 MPa e 12°C por 2,5 min). Em cada célula, os valores seguidos por letras diferentes são estatisticamente diferentes ($P < 0.05$).

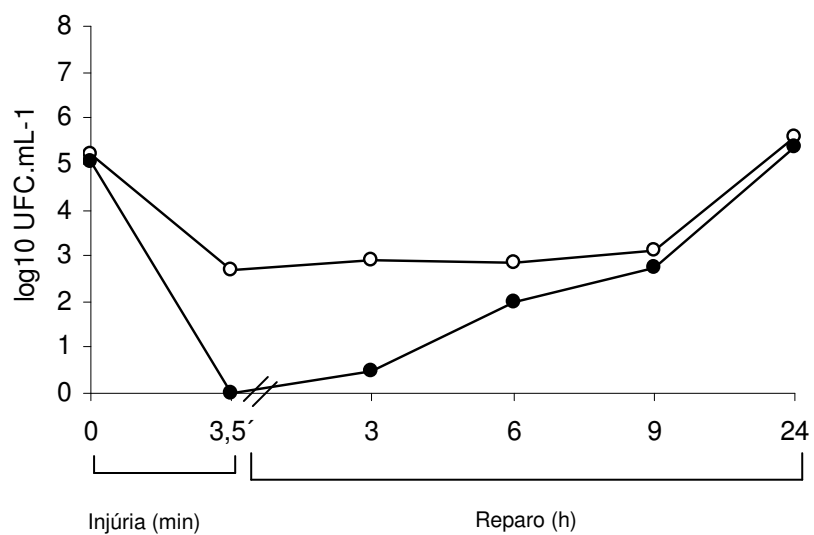


Fig. 1 Comparação da recuperação de *L. monocytogenes* com o ALOA (○) e o ALOA-S (●) após o tratamento com alta pressão por 3,5min (400 MPa/12⁰C) e após enriquecimento em caldo não-seletivo (UVM) por até 24h.

**4 ARTIGO 3: Avaliação dos Efeitos do Pré-enriquecimento Primário e Secundário
para a Detecção de *Listeria monocytogenes* por PCR em Tempo Real em Carne de
Frango Moída**

Abstract

A SYBR® Green I-based real-time PCR assay with *inlA*-specific oligonucleotide primers was developed for easy and rapid detection of *Listeria monocytogenes* in a model food that usually has a high incidence of contamination with this pathogen. Results with pure cultures and artificially contaminated chicken meat samples indicate that the PCR assay was a highly specific and sensitive method. The melting point analysis of the 160-bp amplified DNA fragment was different for *L. monocytogenes* isolates of the two major phylogenetic divisions of the species, 1 and 2. The assay was then used to survey retail ground chicken meat for contamination with *L. monocytogenes*. Thirty seven samples were enriched according to the U.S. Department of Agriculture culture assays to detect *L. monocytogenes* on meat. The use and efficiency of PCR assay was examined following both primary and secondary enrichments, which were also plated on chromogenic agar for enumeration of *L. monocytogenes* and non-pathogenic *Listeria* spp. to investigate the discrepancies between culture and PCR. Overall, *L. monocytogenes* was detected in 75% of the samples. Primary enrichments yielded detection rates of 70% and 37% for culture and PCR, respectively. The corresponding rates for secondary enrichments were 54% and 70% respectively. Test sensitivity is therefore, influenced by the type of enrichment and is probably related not only to the limited growth of *L. monocytogenes* in the primary enrichment media (false-negative PCR results), but also to the high populations of non-pathogenic *Listeria* spp. in the secondary enrichment broths (false-negative culture results). The main challenge of rapid PCR-based detection of *L. monocytogenes* from

food is the poor sensitivity of primary enrichment media. The improvement of enrichment conditions may help increase assay sensitivity.

Key words: (real-time PCR), (*Listeria monocytogenes*), (retail chicken meat) (USDA enrichment media).

Resumo

Um teste de PCR em Tempo Real baseado no *SYBR[®] Green I* com o uso de iniciadores oligonucleotídicos específicos para o gene *inlA* foi desenvolvido para a detecção fácil e rápida de *Listeria monocytogenes* em um alimento que normalmente apresenta alta incidência de contaminação por esse patógeno. Os resultados com cultivos puros e amostras de carne de frango artificialmente contaminadas indicam que o ensaio de PCR foi um método altamente específico e sensível. A análise do *melting point* do fragmento de 160 pares-de-bases amplificados foi diferente para isolados de *L. monocytogenes* pertencentes aos 2 maiores grupos filogenéticos da espécie, os grupos 1 e 2. O teste foi, então, utilizado para pesquisar *L. monocytogenes* em carne de frango picada adquirida no comércio. Trinta e sete amostras foram enriquecidas conforme protocolo estabelecido pelo United States Department of Agriculture (USDA) para a detecção de *L. monocytogenes* em carne. O uso e a eficácia do teste de PCR foi estudado após enriquecimentos primário e secundário, os quais, igualmente, foram plaqueados em ágar cromogênico para a enumeração de *L. monocytogenes* e *Listeria* spp. não patogênica a fim de se avaliar as diferenças entre PCR e o cultivo em placa. Ao todo, *L. monocytogenes* foi detectada em 75% das amostras. Os cultivos primários

alcançaram taxas de 70% e 37% para o cultivo em placa e para PCR, respectivamente. As taxas correspondentes para enriquecimento secundário foram de 54% e 70%, respectivamente. A sensibilidade do teste foi, dessa forma, influenciada pelo tipo de enriquecimento e, provavelmente, está relacionada não somente ao limite de crescimento de *L. monocytogenes* em enriquecimento primário (resultados falso-negativos em PCR), mas também à elevada população de *Listeria* spp. não-patogênica no caldo de enriquecimento secundário (resultados de cultivo falso-negativos). O principal desafio da técnica de detecção de *L. monocytogenes* por PCR a partir de amostras de alimentos é a baixa capacidade do caldo de cultivo de enriquecimento primário para favorecer o desenvolvimento de *L. monocytogenes* frente a outros microrganismos. O aprimoramento das condições de enriquecimento pode incrementar a sensibilidade da técnica.

Palavras-chave: (PCR em Tempo Real), (*Listeria monocytogenes*), (carne de frango comercial), (Caldo de enriquecimento USDA).

Introdução

Listeria monocytogenes é um importante patógeno de origem alimentar, sendo um dos freqüentes contaminantes de produtos cárneos. Os métodos de cultivo são considerados como o “padrão-ouro” para o isolamento e a identificação da espécie patogênica de *Listeria* spp. em amostras de alimentos e de meio-ambiente (Ryser and Marth, 2004), porém despendem muito tempo e trabalho laboratorial para sua realização e podem não ser adequados para se testar carne fresca e outros tipos de alimentos altamente perecíveis (Gasnov et al., 2005). Além disso, os agentes seletivos

no caldo de cultivo de enriquecimento podem inibir o reparo das células de *L. monocytogenes* subletalmente injuriadas (Donnelly, 2002), e cepas não patogênicas de *Listeria* podem apresentar uma maior taxa de multiplicação que *L. monocytogenes* na etapa de crescimento seletivo (Petran & Swanson, 1993; Curiale & Lewus, 1994). Os meios de plaqueamento cromogênicos, atualmente incluídos em grande parte das provas-padrão, constituem-se num aprimoramento significativo para a detecção específica de *Listeria* spp. patogênica (Reisbrodt, 2004). Alguns desses meios, como o “Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti” (ALOA) permitem a recuperação de *L. monocytogenes* injuriadas (Jantzen et al., 2006). A identificação de *L. monocytogenes* em placas de ALOA é presuntiva, pois *L. ivanovii* pode demonstrar a mesma reação (Reisbrodt, 2004). Porém, *L. ivanovii* não é comumente encontrada em carne de frango crua (Ryser & Marth, 2004; Navas et al., 2006).

As técnicas moleculares, tais como PCR em Tempo Real, possuem a mesma sensibilidade que os métodos tradicionais de cultivo, porém, diferenciam-se por sua rapidez e por permitirem que a análise complete-se em 48 h (Gasnov et al., 2005). O sistema de PCR em Tempo Real comercial, que utiliza testes fluorogênicos para a detecção de *L. monocytogenes* em alimentos, geralmente apresenta um funcionamento tão bom quanto, ou melhor, que os meios de cultivo tradicionais (Wan et al., 2003; Silbernagel et al., 2004). O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) adotou o sistema BAX para o monitoramento de *L. monocytogenes* em carne processada e produtos a base de carne de frango (USDA, 2002b). O sistema BAX utiliza o caldo primário padrão de enriquecimento (*University of Vermont-modified Listeria enrichment broth* - UVM1) e, alternativamente, o caldo de enriquecimento

secundário 3-(N-morpholino) ácido propanosulfônico (MOPS)- caldo tamponado de enriquecimento para *Listeria* (buffered *Listeria* enrichment broth- BLEB).

As técnicas baseadas em PCR para a detecção de *L. monocytogenes* são menos sensíveis para patógenos Gram-negativos (Bhagwat, 2003; Bohaychuk et al., 2005), o que pode estar relacionado a baixas contagens de *Listeria* nos cultivos de enriquecimento primário (Norton et al., 2000; Bohaychuk et al., 2005). Por outro lado, diferentes autores demonstraram que um enriquecimento em duas etapas, primário e secundário, é necessário para se obter um alto número de resultados positivos em PCR para *L. monocytogenes* (Pritchard & Donnelly, 1999; USDA, 2002b; Aznar & Alarcón, 2003). Hoffman e Wiedmann (2001) demonstraram que o teste BAX para a pesquisa de *L. monocytogenes* ("BAX for Screening *Listeria monocytogenes* Assay") é mais suscetível a resultado falso-negativo do que o teste BAX para a pesquisa do gênero *Listeria* ("BAX for Screening Genus *Listeria* Assay") porque durante o enriquecimento, *L. monocytogenes* pode sofrer competição com outras espécies de *Listeria* e/ou com a microbiota natural, resultando em menor número.

A avaliação de novos métodos de detecção e de meios de enriquecimento requer validação através da utilização em amostras naturalmente contaminadas, especialmente no caso de carne e outros alimentos altamente contaminados (Pillai and Ricke, 1995). No presente estudo, iniciadores desenhados para a seqüência do gene *inlA* de *L. monocytogenes* foram utilizados em um ensaio de PCR em Tempo Real com o corante SYBR[®] Green I em amostras de carne de frango obtidas no comércio, e os resultados foram comparados à contagem através do plaqueamento em ágar cromogênico (ALOA) para avaliar a diferença entre o cultivo em placa e os resultados de PCR.

Materiais e Métodos

Cepas bacterianas, Meio de Cultivo, Condições de Crescimento

As cepas de referência de *L. monocytogenes* estão listadas na Tabela 1. Doze diferentes cepas de *Listeria* spp., que não *L. monocytogenes*, e cinco diferentes cepas de outros gênero bacterianos foram utilizadas. Os cultivos foram recuperados a partir de cultura estoque mantida a -20°C, e o crescimento realizado em Caldo de soja Triptona com Extrato de Levedura (TSYEB). Para a determinação do número de células, os cultivos foram diluídos em série (1:10) em 0,1% (peso/vol) em água peptonada. Porções duplicadas de 0,1 mL de cada diluição foram plaqueados na superfície de ágar de soja triptona com extrato de levedura (TSYEA) para a contagem total da microbiota aeróbia, ou em ALOA para a contagem de *L. monocytogenes* e *Listeria* spp. As colônias foram enumeradas após incubação aeróbia a 30°C por 48h em TSYEA, ou a 37°C por 24h em ALOA. A contagem celular foi realizada pela média da contagem de duas placas. Caldos de enriquecimento primário e secundário preconizados pela USDA para a detecção de *L. monocytogenes* por PCR (UVM1 e MOPS-BLEB) (USDA, 2002b) foram utilizados para o enriquecimento seletivo de amostras comerciais de carne. Todos os meios de cultivo foram obtidos da Biolife (Milan, Italy), exceto o ágar desidratado ALOA (Chromogen™ *Listeria*, Biomedics, Madrid, Spain).

Amostras de carne de frango moídas, artificialmente contaminadas

A carne de frango moída (naturalmente contaminada) foi inoculada em caldo de enriquecimento servindo de modelo para avaliar o efeito da matriz alimentar no preparo do teste. A amostra de frango crua foi obtida do comércio local, e porções de 500g foram moídas com o uso de um triturador doméstico por 10s. Porções individuais de 25g foram assepticamente pesadas em sacos de *stomacher*, e congeladas a -20°C por um máximo de 2 meses. As amostras foram descongeladas e transferidas para acondicionamento a 4°C por 24h antes de se adicionar 225mL de caldo de enriquecimento (UVM1), e foram homogeneizadas por 2min em um *stomacher* (Lab-Blender 400, Tekmar, Cincinnati, OH, USA). Alíquotas de 25mL da amostra homogeneizada foram distribuídas em tubos estéreis do tipo Falcon. *L. monocytogenes* EGD-e foi cultivada em TSYEB por 18h a 30°C , diluída em água peptonada a 0,1% de, e inoculada em cada subamostra para atingir concentrações finais de 10^{-2} a 10^6 UFC.mL⁻¹ de amostra (equivalente a 10^{-1} a 10^7 UFC.g⁻¹). As amostras artificialmente inoculadas foram transferidas para um incubador a 30°C para o enriquecimento. O plaqueamento para a contagem de colônias e para o PCR foi realizado antes e depois de incubação por 6 e 24 h.

Amostras Comerciais de Frango

Trinta e sete amostras de frango cruas e moídas (provavelmente contendo *Listeria*) originárias de diferentes pontos comerciais locais, e de diferentes marcas, ou datas

diferentes de embalagem no caso de pertencerem à mesma marca, foram homogeneizadas como descrito anteriormente (25g em 225mL de meio de enriquecimento primário). O enriquecimento foi conduzido e incubado de acordo com o procedimento indicado pelo USDA para a detecção de *L. monocytogenes* por PCR (USDA, 2002b) (Tabela 2).

Extração de DNA a partir de cultivos puros e de cultivos em caldo de enriquecimento

Todas as cepas de referência foram cultivadas em TSYEB a 30°C por 48h. Após a incubação, 1mL do caldo foi centrifugado e o pellet resuspendido em 1mL de água, para, em seguida ser fervido por 10min. Os lisados foram, primeiramente, testados com PCR convencional direcionada para seqüências-alvo conservadas de rDNA (Graham et al., 1996) e, se positivos, eram utilizados como amostras para a prova de PCR em Tempo Real.

Uma alíquota de 1mL do enriquecimento primário foi centrifugada a 500 X *g* por 15s para eliminar os restos da matriz da amostra. O sobrenadante foi decantado e as células bacterianas foram precipitadas por centrifugação a 13.000 X *g* por 10min. Já os enriquecimentos secundários foram apenas centrifugados a uma alta velocidade. As células precipitadas foram lavadas em 1mL de água destilada e ressuspendidas em 0,1mL de resina Chelex-100 (Instagene™, Biorad) e lisadas de acordo com as instruções do fabricante. A purificação de *L. monocytogenes* através de Chelex-100 a partir de produtos cárneos artificialmente contaminados foi anteriormente descrita (Rodriguez-Lazaro et al., 2004).

PCR em Tempo Real

Os iniciadores para PCR foram desenhados com o auxílio do programa computacional *Primer3 software* (Rozen & Skaletsky, 2000) para uma região-alvo específica da sequência do gene *inlA* de *L. monocytogenes* (Doumith et al., 2004). O iniciador *forward* INLAF_e1 (TGGCTTTCAGCTGGGCATAACCAA), e o iniciador reverso INLAR_e1 (GCGGTCAGTGTA AAAAGTGGCACA) foram sintetizados pela empresa MWG-Biotech AG (Alemanha) e mantidos a -20°C antes de seu uso. O teste de PCR em Tempo Real foi conduzido em um volume de 25µL, contendo *Brilliant™ SYBR® Green QPCR Master Mix* (*Stratagene*), iniciadores (concentração final de 300nM, escolhida após otimização), e 2,5µL de amostra ou de DNA-alvo. As condições térmicas dos ciclos foram as seguintes: 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 95°C por 15s, 60°C por 1min e 72°C por 1min. Os ciclos térmicos, os dados de fluorescência, e a análise de dados foram realizados pelo sistema de detecção e programa computacional Mx3000P de acordo com as instruções do fabricante (*Stratagene*). Os dados armazenados durante o programa de amplificação foram obtidos tanto a partir da etapa de anelamento quanto da etapa de extensão de cada ciclo. Durante o programa de dissociação, onde a temperatura aumenta de 55°C para 95°C, a 0,5°C/ciclo, as medidas de fluorescência foram tomadas a cada incremento de temperatura.

RESULTADOS

Especificidade do teste de PCR em Tempo Real

Todas as 15 cepas de referência de *L. monocytogenes* testadas foram positivas e produziram valores de ciclo *threshold* (C_t) entre 12,3 e 18,1 (Tabela 1). Todas as outras espécies de *Listeria* e de não-*Listeria* foram negativas no teste e produziram valores de C_t acima de 40. A análise do ponto de dissociação das fitas duplas de DNA amplificadas (*melting point*) foram diferentes para os isolados de *L. monocytogenes* pertencentes às duas maiores divisões filogenéticas da espécie, os grupos 1 e 2. Cepas da linhagem 1 demonstraram uma temperatura de dissociação (*melting temperature* – T_m) abaixo de 77,1°C (Tabela 1). A seqüência nucleotídica de 160-pb da região amplificada do gene *inlA*, obtida a partir de dados do GenBank, demonstrou um número de substituições (entre 9 e 14 nucleotídeos) para a linhagem 1 comparada às cepas da linhagem 2, o que explica os diferentes valores de T_m .

Sensibilidade do teste de PCR com Cultivos Puros

A curva padrão formada através dos valores obtidos de C_t para várias concentrações de *L. monocytogenes* (a partir de 1 a 10^7 UFC.mL⁻¹), demonstrou uma boa resposta linear ($R^2 = 0,993$) a partir de 10^2 até 10^6 UFC.mL⁻¹. O limite de sensibilidade com cultivos puros foi menor do que 10^2 UFC.mL⁻¹.

Detecção de L. monocytogenes a partir de amostras de carne de frango moída inoculadas artificialmente

A carne de frango foi primeiramente confirmada como negativa para a presença de *Listeria* spp. pelo método de cultivo USDA (USDA, 2002a) e, então, homogeneizada e inoculada com *L. monocytogenes*. Antes do enriquecimento, a PCR em Tempo Real detectou e quantificou com sucesso 10^3 UFC.g⁻¹ (equivalente a 10^2 UFC.mL⁻¹) (Figura 1). O coeficiente de correlação da curva padrão foi de 0,995, demonstrando uma boa linearidade da resposta a partir de 10^3 até 10^6 UFC.g⁻¹. Após 6 h de enriquecimento, o limite da sensibilidade foi de 10 UFC.g⁻¹, enquanto que após 24 h de enriquecimento detectou-se 1 UFC.g⁻¹ através da PCR em Tempo Real, estimando-se um tempo total de menos de 30h para a realização completa do teste.

Detecção de L. monocytogenes e da microbiota acompanhante em amostras comerciais de frango

A contagem da microbiota aeróbia variou antes e após o enriquecimento, apresentando contagens a partir de 10^3 a 10^6 UFC.mL⁻¹; após ambos tipos de enriquecimento, estas contagens foram de 10^7 a 10^9 UFC.mL⁻¹.

Uma comparação entre os resultados dos cultivos e da PCR em Tempo Real está sintetizada na Tabela 2. Todas as amostras que produziram resultados não correlacionados por ambos os métodos foram retestados em triplicata no teste de PCR, e esse segundo resultado foi levado em consideração. Os resultados combinados obtidos em todos os métodos de detecção empregados indicaram que 75,6% das amostras de frango foram positivas para *L. monocytogenes* (Tabela 2). Todas as

amostras positivas no método de cultivo em placa apresentaram menos de 100 UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* antes do enriquecimento, pois nenhuma colônia de *L. monocytogenes* foi detectada pelo plaqueamento direto em ALOA. Entretanto, as amostras positivas para *L. monocytogenes* pelo cultivo em placa apresentaram, algumas vezes, resultados negativos pela técnica de PCR e vice-versa, com poucas amostras apresentando *L. monocytogenes* em nível detectável após ambos processos, exceto no caso do método combinado completo indicado pelo USDA (Tabela 2).

Os resultados de detecção de *L. monocytogenes* pelo teste de PCR em Tempo Real após o enriquecimento secundário pelo método USDA foram comparados com os resultados obtidos pelo subcultivo em placas de ALOA para os enriquecimentos primário e secundário do mesmo protocolo. Nenhuma diferença foi encontrada entre o número de amostras positivas para *L. monocytogenes*-positiva pela metodologia de cultivo ou pela de PCR (Tabela 2). Tanto a PCR em Tempo Real, quanto o cultivo em placa, detectaram *L. monocytogenes* em 26 das 37 amostras (70,2%). Vinte e seis amostras foram positivas em ambos os métodos, enquanto que 27 foram positivas por um ou outro método (Tabela 2).

Os resultados das amostras enriquecidas com os caldos UVM1 e com MOPS-BLEB antes do cultivo em placas de ALOA e do teste de PCR estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. No total, *L. monocytogenes* foi detectada por cultivo ou PCR em 28 amostras (75,6%) (Tabela 2). Foi, também, observado que nenhuma amostra foi negativa por PCR e positiva para o cultivo em placa quando ambos meios de enriquecimento foram utilizados.

O método de cultivo em placa e a PCR apresentaram resultados concordantes para ambos os caldos de enriquecimento em 17 amostras, conforme apresentado na Tabela

3. Um total de 9 amostras (grupo A) foram negativas em ambos métodos e por ambos caldos de enriquecimento, e 7 amostras (grupo B) foram positivas por ambos métodos para ambos caldos de enriquecimento. Uma amostra (grupo C) apresentou resultado concordante por ambos os métodos com cada um dos tipos de enriquecimento, porém o resultado (positivo ou negativo) foi diferente para cada caldo de enriquecimento.

As amostras com os resultados discordantes para o cultivo em placa e para PCR estão apresentados na Tabela 4 (grupos D1, D2 e D3, com resultados discrepantes nos caldos de enriquecimento primário, secundário, ou ambos, respectivamente).

Quinze enriquecimentos foram PCR-negativo, cultivo-positivo. Todos resultados foram obtidos a partir do uso do cultivo primário, e a maioria deles apresentaram baixas contagens de *L. monocytogenes* ($\leq 3 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹, Tabela 4). Duas dessas 15 amostras (nº 21 e 2, com 3×10^3 e 2×10^3 UFC.mL⁻¹, respectivamente), foram testadas para a presença de inibidores da PCR. Após as amostras serem comparadas com DNA purificado de *L. monocytogenes* EGD-e, ambas apresentaram resultado positivo, porém com valores de C_t aumentados em 6,3 e 3,5, respectivamente, comparando-se aos valores de C_t do DNA controle. De acordo com o método USDA completo (Tabela 2), somente uma amostra (nº 12) foi PCR-negativa/cultivo-positiva (Tabela 3).

Oito amostras (nº 5, 10, 34, 2, 14, and 19, a partir do enriquecimento secundário, e os nº 22 e 14, a partir do enriquecimento primário) foram PCR-positivo/cultivo-negativo para *L. monocytogenes*. Os valores C_t no teste de PCR em Tempo Real para esses 8 enriquecimentos estavam entre 32,5 and 38,6, com 4 deles estando acima de 35 (Tabela 4).

De acordo com a metodologia completa USDA (Tabela 2) somente uma amostra (nº 14) foi PCR-positiva/cultivo-negativo (Tabela 4).

Discussão

As amostras com resultados similares obtidos tanto pelo método de cultivo em placa quanto por PCR, demonstraram que o principal fator relacionado ao resultado de PCR e aos valores de C_t foi o número de células de *L. monocytogenes* (Tabela 3, grupo B). Da mesma forma, todas as 15 amostras com resultados PCR-negativo/cultivo-positivo apresentaram contagens de *L. monocytogenes* no enriquecimento primário abaixo de 10^4 UFC.mL⁻¹. A carne de frango moída não pareceu causar uma forte inibição do ensaio de PCR, entretanto, uma inibição parcial poderia modificar os limites de detecção, como foi observado em amostras inoculadas artificialmente com concentrações entre 10^2 UFC.mL⁻¹ e 10^4 UFC.mL⁻¹.

As contagens de outras espécies de *Listeria* não parecem ter influenciado os resultados de PCR já que houve várias amostras com 10^6 - 10^7 UFC.mL⁻¹ de *Listeria* não-*monocytogenes* que foram PCR-positivas (Tabela 4). Entretanto, 5 das 8 amostras que foram PCR-positiva/cultivo-negativo para *L. monocytogenes* (amostras 10, 34, 2, 14, 19, todas em enriquecimento secundário) obtiveram contagens de *Listeria* não-*monocytogenes* a partir de 8×10^6 até $6,7 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹, o que poderia mascarar ou inibir *L. monocytogenes*. Além disso, a amostra nº 19 apresentou T_m de 76,8, o que é típico de cepas da linhagem 1 (Tabela 1), e a recuperação de cepas da linhagem 1 também poderiam ser afetadas negativamente por componentes do UVM1 (Bruhn et al., 2005).

O sexto resultado das 8 amostras PCR-positiva/cultivo-negativo (amostra nº 5, também em enriquecimento secundário) apresentou somente 3×10^3 UFC.mL⁻¹ de

Listeria não-*monocytogenes* e, provavelmente, necessita de uma explicação diferente. Cepas não-virulentas de *L. monocytogenes* originárias principalmente de alimentos que apresentaram baixas taxas de recuperação no ágar seletivo, incluindo o ALOA, foram relatadas por Gracieux et al., 2003, e isto poderia explicar alguns resultados de PCR falso-positivo. A amostra nº 14 também apresentou resultado PCR-positiva/cultivo-negativo, porém, nesse caso, em ambos caldos de enriquecimento (Tabela 4). O resultado do enriquecimento primário novamente poderia ter ocorrido pela baixa recuperação dessa cepa em ALOA. A última amostra com resultado PCR-positiva/cultivo-negativo (nº 22, no enriquecimento primário), pode ter apresentado cultivo-negativo para *L. monocytogenes* pela baixa capacidade tamponante ou pela acriflavina presente no caldo (Asperger et al., 1999), ou qualquer outra causa de inibição de *L. monocytogenes* no caldo de enriquecimento UVM1. Esses ou outros inibidores de *L. monocytogenes* no caldo UVM1 também poderiam explicar o resultado PCR-negativo/cultivo-negativo no caldo de enriquecimento MOPS-BLEB (Tabela 4). Novamente, o resultado de PCR dessa amostra demonstrou uma T_m de 76,3, o qual é semelhante à T_m de cepas da linhagem 1, de acordo com a Tabela 1, e isto poderia estar afetando negativamente os resultados de cultivo a partir do caldo UVM1 ((Bruhn et al., 2005).

O teste PCR poderia detectar *L. monocytogenes* a partir de amostras de alimentos naturalmente contaminadas com 5×10^2 UFC.mL⁻¹ de cultivo em enriquecimento primário (Tabela 3), portanto não previne sinais falso-positivos em PCR com células não viáveis. Nas amostras com resultados PCR-positivo em decorrência de células mortas, espera-se que apresentem resultado cultivo-negativo em todos os caldos de enriquecimento. Isso poderia ser uma explicação para a amostra nº 22 (Tabela 4),

porém o nível de contaminação correspondente de $>5 \times 10^3$ células não-viáveis.g⁻¹ seria raro. A fim de se monitorar a viabilidade bacteriana, os métodos baseados em RNA deveriam ser utilizados, entretanto, a sensibilidade, a dificuldade e a variação de uma amostra para outra limita o uso rotineiro de métodos baseados no RNA (Keer and Birch, 2003; Navas *et al.*, 2005).

Finalmente, os resultados das amostras do grupo C (Tabela 3), sugerem uma desvantagem do caldo de enriquecimento secundário em *L. monocytogenes* contra *Listeria* não-*monocytogenes* no

CONCLUSÃO

A evidência do crescimento limitado de *L. monocytogenes* em enriquecimento primário, e o maior crescimento de outras espécies no enriquecimento secundário, sugere uma reavaliação dos procedimentos de enriquecimento existentes atualmente. A provável solução seria incrementar o número de células de *L. monocytogenes* a um nível detectável por PCR em um curto período de tempo.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado por fundos do Ministério da Educação da Espanha, projeto CAL03-027-C2-1, PTR1995-0789-OP, e RTA2005-00202-C02-C1 e bolsas de estudo do INIA da Espanha (J.N.Fernandes) e do CNPq do Brasil (M.M. Jantzen).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Asperger, H., H. Heisteringer, M. Wagner, et al. 1999. A contribution of *Listeria* enrichment methodology-growth of *Listeria monocytogenes* under varying conditions concerning enrichment broth composition, cheese matrices and competing microbial flora. Food Microbiol. 16:419-431.

Aznar, R., and B. Alarcon. 2003. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. J. Appl. Microbiol. 95:958-966.

- Bhagwat, A.A. 2003. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 84:217-224.
- Bohaychuk, V.M., G.E. Gensler, R.K. King, et al. 2005. Evaluation of detection methods for screening meat and poultry products for the presence of foodborne pathogens. *J. Food Prot.* 68:2637-2647.
- Bruhn, J.B., B.F. Vogel, and L. Gram. 2005. Bias in the *Listeria monocytogenes* enrichment procedure: lineage 2 strains outcompete lineage 1 strains in University of Vermont selective enrichments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:961-967.
- Curiale, M.S., and C.W. Lewus. 1994. Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. *J. Food Prot.* 57:1048-1051.
- Donnelly, C.W. 2002. Detection and isolation of *Listeria monocytogenes* from food samples: implications of sublethal injury. *J. AOAC Int.* 85:495-500.
- Doumith, M., C. Cazalet, N. Simoes, et al. 2004. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect. Immun.* 72:1072-1083.
- Gasanov, U., D. Hughes, and P. M. Hansbro. 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol. Reviews.* 29:851-875.
- Gracieux, P., S.M. Roche, P. Pardon, et al. 2003. Hypovirulent *Listeria monocytogenes* strains are less frequently recovered than virulent strains on PALCAM and Rapid' L. mono media. *Int. J. Food Microbiol.* 83:133-145.
- Graham, T., E. J. Golsteyn-Thomas, V.P. Gannon, et al. 1996. Genus- and species-specific detection of *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction assays

targeting the 16S/23S intergenic spacer region of the rRNA operon. Can. J. Microbiol. 42:1155-1162.

Hoffman, A.D., and M. Wiedmann. 2001. Comparative evaluation of culture- and BAX polymerase chain reaction-based detection methods for *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in environmental and raw fish samples. J. Food Prot. 64:1521-1526.

Jantzen, M.M., J. Navas, M. de Paz, et al. 2006. Evaluation of ALOA plating medium for its suitability to recover high pressure injured *Listeria monocytogenes* from ground chicken meat. Lett. Appl. Microbiol. (in press, online early doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01950.x).

Keer, J.T., and L. Birch. 2003. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. J. Microbiol. Methods 53:175-183.

Navas, J., S. Ortiz, and J.V. Martinez-Suarez. 2005. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* in chicken meat enrichments by PCR and reverse-transcription PCR without DNA/RNA isolation. J. Food Prot. 68:407-410.

Navas, J., S. Ortiz, P. Lopez, et al. 2006. Presencia frecuente de *Listeria monocytogenes* en hamburguesas comerciales de pollo asociada con bajos recuentos y alta diversidad genética. Alimentaria 373:90-91.

Norton, D.M., M. McCamey, K.J. Boor, et al. 2000. Application of the BAX for screening/genus *Listeria* polymerase chain reaction system for monitoring *Listeria* species in cold-smoked fish and in the smoked fish processing environment. J. Food Prot. 63:343-346.

Petran, R.L., and K.M.J. Swanson. 1993. Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. J. Food Prot. 56:616-618.

Pillai, S.D., and Ricke, S.C. 1995. Strategies to accelerate the applicability of gene amplification protocols for pathogen detection in meat and meat products. *Crit. Rev. Microbiol.* 21:239-261.

Pritchard, T.J., and C.W. Donnelly. 1999. Combined secondary enrichment of primary enrichment broths increases *Listeria* detection. *J. Food Prot.* 62:532-535.

Reissbrodt, R. 2004. New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp. - an overview. *Int. J. Food Microbiol.* 95:1-9.

Rodriguez-Lazaro, D., A. Jofre, T. Aymerich, et al. 2004. Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6299-6301.

Rozen, S., and H. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132:365-386.

Ryser, E.T., and E.H. Marth. 2004. *Listeria*, listeriosis and food safety. Third Edition. Marcel Dekker Inc., New York, USA.

Silbernagel, K., R. Jechorek, W.M. Barbour, et al. 2004. Evaluation of the BAX system for detection of *Listeria monocytogenes* in foods: collaborative study. *J. AOAC Int.* 87:395-410.

USDA, 2002a. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples. In: *Microbiology Laboratory Guidebook* [on line]. Available: www.fsis.usda.gov/OPHS/microlab/mlgbook.htm.

USDA, 2002b. Procedure for the Use of *Listeria monocytogenes* BAX Screening Test. In: *Microbiology Laboratory Guidebook* [Online]. Available: www.fsis.usda.gov/OPHS/microlab/mlgbook.htm.

Wan, J., K. King, S. Forsyth S, et al. 2003. Detection of *Listeria monocytogenes* in salmon using the Probelia polymerase chain reaction system. J. Food Prot. 66:436-440.

TABELA 1. TEMPERATURA DE DISSOCIAÇÃO (T_m) E VALORES C_t OBTIDOS EM PCR A PARTIR DE DIFERENTES CEPAS DE *L. monocytogenes*

<i>Organismo</i>	<i>Fonte</i> ^a	<i>Cepa ou n° de referência.</i> ^a	<i>Linhagem</i>	<i>Sorotipo</i>	C_t	T_m (°C) ^b
<i>L. monocytogenes</i>	CECT	CECT 936	1	1/2b	12.3	77,11 ± 0,04
<i>L. monocytogenes</i>	CECT	CECT 937	1	3b	13.4	77,03 ± 0,13
<i>L. monocytogenes</i>	CECT	ATCC 19115	1	4b	13.1	76,69 ± 0,18
<i>L. monocytogenes</i>	CECT	Scott A	1	4b	14.2	76,77 ± 0,22
<i>L. monocytogenes</i>	CECT	ATCC 13932	1	4b	14.2	76,61 ± 0,17
<i>L. monocytogenes</i>	CECT	ATCC 19117	1	4d	18.1	76,71 ± 0,16
<i>L. monocytogenes</i>	CECT	ATCC 15313	2	1/2a	18.1	78,03 ± 0,10
<i>L. monocytogenes</i>	C. Jacquet, IP	H2446 (CDC)	2	1/2a	15.1	78,05 ± 0,25
<i>L. monocytogenes</i>	J.C. Perez-Diaz, HRYC	EGD-e	2	1/2a	15.0	77,89 ± 0,15
<i>L. monocytogenes</i>	CECT	ATCC 35152	2	1/2a	16.6	77,88 ± 0,20
<i>L. monocytogenes</i>	CECT	ATCC 19113	2	3a	17.5	77,98 ± 0,20
<i>L. monocytogenes</i>	CECT	ATCC 19112	2	1/2c	18.0	77,90 ± 0,00
<i>L. monocytogenes</i>	M. Suarez, UCM	LO28	2	1/2c	15.3	77,99 ± 0,22
<i>L. monocytogenes</i>	CECT	CECT 938	2	3c	15.0	77,91 ± 0,10
<i>L. monocytogenes</i>	CECT	ATCC 19114	3	4a	15.2	77,61 ± 0,16

^a CECT, Colección Española de Cultivos Tipo; IP, Institut Pasteur (Paris); HRYC, Hospital Ramon y Cajal (Madrid); UCM, Universidad Complutense de Madrid; ATCC, American Type Culture Collection; CDC, Centers for Disease Control;

^b Os valores são médias ± de desvio para dois ensaios independentes em triplicata.

TABELA 2. RESULTADOS DA CONTAGEM DE *L. monocytogenes* EM CULTIVO E EM PCR EM TEMPO REAL APÓS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ENRIQUECIMENTO

<i>Tipo de enriquecimento</i>	<i>Condições</i>	<i>Nº de amostras testadas</i>	<i>Nº (%) de positivos no subcultivo em ALOA</i>	<i>Nº (%) positivos na PCR em Tempo Real</i>	<i>Nº (%) positivos em um método ou outro</i>	<i>Nº (%) em ambos os métodos</i>	<i>Nº (%) concordância</i>
Primário	UVM1, 24 h, 30°C	37	26 (70,2)	14 (37,8)	28 (75,6)	11 (29,7)	20 (54,0)
Secundário	MOPS-BLEB, 24 h, 37°C	37	20 (54,0)	26 (70,2)	26 (70,2)	20 (54,0)	31 (83,7)
USDA	Primário e secundário para o cultivo, e secundário para PCR	37	26 (70,2)	26 (70,2)	27 (72,9)	26 (70,2)	35 (94,5)

TABELA 3. DETECÇÃO DE *L. monocytogenes* ATRAVÉS DO SUBCULTIVO EM ÁGAR CROMOGÊNICO (ALOA) E EM PCR EM TEMPO REAL: AMOSTRAS COM RESULTADOS SIMILARES EM CADA TIPO DE ENRIQUECIMENTO

Grupo da amostra ^a (e no. da amostra)	Tipo de enriquecimento	Subcultivo em ALOA (UFC.mL ⁻¹)		PCR	
		LM ^b	NLM ^b	valor C _t	T _m (°C)
A (11, 13, 15, 18, 20, 24, 28, 31, 33)	Primário	<5	<5 - 4x10 ⁵	>40	
	Secundário	<5	<5 - 1,1x10 ⁷	>40	
B (4, 6, 9, 16, 23, 25, 37)	Primário	4x10 ³ - 6x10 ⁵	<5 - 4,3x10 ⁵	27,6 - 36,3	76,5 - 77,9
	Secundário	5x10 ² - 2x10 ⁷	1x10 ² - 1,1x10 ⁷	19,3 - 35,1	76,9 - 78,0
C (12)	Primário	1x10 ³	4x10 ⁵	37,9	77,7
	Secundário	<5	7x10 ⁶	>40	

^a A, amostras negativas; B, amostras positivas; C, amostras com resultados concordantes porém diferentes (positivo ou negativo) para cada tipo de enriquecimento.

^b LM, colônias com halo, possivelmente *L. monocytogenes*; NLM, colônias sem halo, *Listeria não-monocytogenes*.

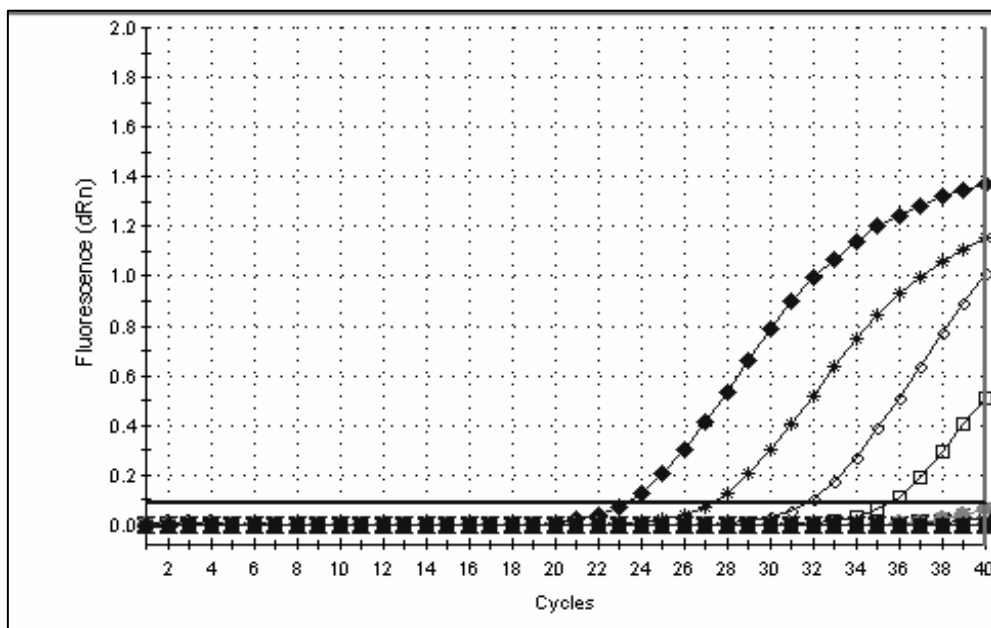
TABELA 4. DETECÇÃO DE *L. monocytogenes* ATRAVÉS DE SUBCULTIVO EM ÁGAR CROMOGÊNICO E PCR EM TEMPO REAL: AMOSTRAS COM RESULTADOS SEM CONCORDÂNCIA EM UM OU OUTRO TIPO DE ENRIQUECIMENTO

Grupo da amostra ^a (e n. da amostra)	Tipo de enriquecimento	Subcultivo em ALOA (UFC.mL ⁻¹)		PCR		Concordância (e possível explicação da não-concordância)
		LM ^b	NLM ^b	Valor C _t	T _m (°C)	
D ₁ (1, 3, 7, 8, 17, 21, 26, 27, 29, 30, 32, 35, 36)	Primário	5 - 3x10 ³	<5 - 3x10 ⁴	>40		Não (baixa concentração LM?)
	Secundário	10 - 1x10 ⁵	<5 - 9x10 ⁶	28.7 - 38.3	77.3 - 78.2	Sim
D ₁ (22)	Primário	<5	1x10 ⁴	36.7	76,3	Não (inibição de LM?)
	Secundário	<5	1x10 ⁷	>40		Sim
D ₂ (5)	Primário	5x10 ²	2x10 ⁴	33,2	77,7	Sim
	Secundário	<5	3x10 ³	33,3	78,0	Não (inibição de LM?)
D ₂ (10)	Primário	3x10 ⁴	6x10 ³	34,6	77,8	Sim
	Secundário	<5	2x10 ⁷	33,2	77,6	Não (alta concentração NML?)
D ₂ (34)	Primário	5x10 ³	2x10 ⁶	36,8	77,6	Sim
	Secundário	<5	6,7x10 ⁷	34,4	78,2	Não (alta concentração NML?)
D ₃ (2)	Primário	2x10 ³	3x10 ³	>40		Não (baixa concentração LM?)
	Secundário	<5	8x10 ⁶	38,6	77,8	Não (alta concentração NML?)
D ₃ (14)	Primário	< 5	4x10 ⁴	36,9	77,5	Não (inibição de LM?)
	Secundário	< 5	1x10 ⁷	37,4	78,1	Não (alta concentração NML?)
D ₃ (19)	Primário	4,5x10	1x10 ⁴	>40		Não (baixa concentração LM?)
	Secundário	<5	1x10 ⁷	32,5	76,8	Não (alta concentração NML?)

^a D, amostras com resultados discrepantes para o cultivo e para PCR no enriquecimento primário (D₁), o enriquecimento secundário (D₂), ou em ambos (D₃).

^b LM, colônias com halo, possivelmente *L. monocytogenes*; NLM, colônias sem halo, *Listeria não-monocytogenes*.

Figura 1. Amplificação da seqüência *inlA* de células de *Listeria monocytogenes* por PCR em Tempo Real. Os valores de fluorescência e de *Ct* foram obtidos de cepas EGD-e inoculadas em amostras de carne de frango homogeneizadas a concentrações de 10^5 (■), 10^4 (*), 10^3 (○), e 10^2 (□) UFC.mL⁻¹



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle de microrganismos patogênicos ao longo da linha de processamento dos alimentos é um fator relevante não somente no que diz respeito à saúde pública. Sua relevância torna-se imprescindível também nas exportações dos produtos de nosso país, já que as políticas de importação de outros países estão cada vez mais exigentes, principalmente pelo protecionismo de seu mercado interno. Algumas agências fiscalizadoras internacionais definem, inclusive, “tolerância zero” para algumas bactérias patogênicas. Como exemplo podemos citar os EUA, o qual somente aceita laudos para importação de alimentos com diagnóstico de *L. monocytogenes* ausente em 25g de amostra (CDC, 2000).

Por esse motivo muitos esforços são dispendidos para se alcançar um mínimo de contaminação de *L. monocytogenes* dentro da planta de processamento de alimentos. Nesse panorama, da mesma forma, se intensificam as pesquisas para que técnicas rápidas e precisas estejam ao alcance da indústria alimentícia para o controle do processo e de seus produtos. Assim, a metodologia tradicional é utilizada para o controle por órgãos oficiais de regulamentação do comércio seguro de alimentos, enquanto que *kits* de diagnóstico (cromogênicos, imunológicos ou PCR) são utilizados como controle interno nos programas de garantia de qualidade das indústrias.

O controle das principais bactérias causadoras de doenças transmitidas por alimentos é feito, geralmente, através de “barreiras” que dificultem a sobrevivência dos microrganismos. Melhores resultados são atingidos quando são utilizados mais de um tipo de processo ou de método de controle: bacteriocinas, altas pressões, irradiação, temperatura, ultrapasteurização, controle da atividade de água, controle do pH, controle do potencial de oxirredução dos alimentos através do uso de aditivos e conservantes; etc.

A combinação de tratamentos proporciona grandes reduções nas contagens dos patógenos em alimentos. Por exemplo, a combinação de 250MPa (redução de 2,2 Log₁₀) com a aplicação de lacticina (redução de 1 Log₁₀) resulta em morte de mais de 6 Log₁₀ na população de *L. innocua*. (Morgan et al., 2000). Atualmente, o uso de compostos fenólicos (100ppm) aplicados antes do tratamento de altas pressões (400 MPa/5') otimizou o processo e evitou a recuperação de células injuriadas (Vurma et al., 2006)

As tecnologias que utilizam processamentos não térmicos apresentam particularidades quanto ao tipo de alimento que podem ser empregadas. Por exemplo, a alta pressão, os campos magnéticos oscilantes, os antimicrobianos e os pulsos luminosos podem ser utilizados tanto em alimentos líquidos quanto sólidos, enquanto que os campos elétricos pulsantes são recomendados para alimentos líquidos e a irradiação para os sólidos. Essas peculiaridades podem interferir na otimização do processamento a fim de se evitar ao máximo a permanência de bactérias injuriadas e que mais tarde podem recuperar-se em situações favoráveis a seu metabolismo.

Apesar da tecnologia de altas pressões ainda não ser utilizada por indústrias processadoras de alimentos no Brasil, diversos grupos de pesquisadores estão trabalhando em pesquisas para o aprimoramento desse tipo de tratamento (Mignaco et al., 2005) e também realizam intenso intercâmbio com trabalhos realizados por países que já utilizam como rotina esse tratamento em alguns produtos, como o Japão, Estados Unidos e outros da Europa, entre eles a Espanha. Nesses países, é possível encontrar nas prateleiras dos supermercados produtos como presunto (e outros embutidos fatiados), ostra e sucos de frutas, tratados com a tecnologia de altas pressões.

Por esses motivos, e por ser utilizada não somente para a conservação, como também para o melhoramento das propriedades reológicas e funcionais dos alimentos, utilizaram-se as altas pressões no experimento para avaliação da eliminação de *L. monocytogenes* em carne de frango. De acordo com Barbosa-Cánovas, Pothakamury & Palou (1998), a inativação de enzimas promove a conservação, além dos nutrientes e aromas serem mantidos ou mesmo intensificados. Porém, neste experimento, o uso das

altas pressões, mesmo com baixas temperaturas, não seria indicado para aplicação diretamente em carnes frescas, pois as características visuais da carne foram alteradas. As principais características a sofrerem alteração com o tratamento utilizado foram ligadas à cor (palidez), e à firmeza (maior elasticidade). Provavelmente por essa razão, os produtos cárneos tradicionalmente pressurizados são os embutidos, já que suas características reológicas-padrão assemelham-se aquelas provocadas pelo aumento de pressão.

Geralmente nos experimentos em que amostras de alimentos são inoculadas artificialmente, utiliza-se a cepa padrão disponível no laboratório. Porém, devemos levar em consideração, que nem sempre os diferentes sorotipos de *L. monocytogenes* apresentam as mesmas características de virulência ou resistência a fatores adversos. Cita-se como exemplo a pesquisa de Karatzas & Bennik (2002), onde uma cepa de *L. monocytogenes* Scott A, denominada AK01, demonstrou ser mais resistente ao tratamento com 150-500 MPa por 20 min, quando comparada a cepas de campo, mesmo quando diluições de $2 \log_{10}$ foram utilizadas. Essa pesquisa revela a importância de utilizar cepas padrão e cepas de campo quando a finalidade é calibrar um equipamento para o processamento de determinado alimento. Outro estudo também demonstrou a diferença de cepas de *Listeria* às pressões empregadas (Abdullatif et al., 2003).

No próprio experimento da PCR em tempo real, o uso de diferentes cepas de *L. monocytogenes* demonstrou que a análise do *melting point* do fragmento de 160-pb amplificado na reação foi diferente para as duas maiores divisões filogenéticas da espécie (1 e 2).

Nos programas de controle de microrganismos em alimentos, é de fundamental importância evitar a permanência de células viáveis. Existem alguns fatores que podem incrementar a resistência das células sobreviventes, tais como as proteínas do choque térmico (*Csp*). O trabalho realizado por Whemekamp-Kamphuis et al. (2002) comprovou que essas proteínas estavam em maior concentração após o tratamento com altas pressões, com um aumento de 3,5 e de 2 vezes para *Csp1* e *Csp2*, respectivamente. Essas proteínas auxiliam na sobrevivência e recuperação nas etapas subseqüentes ao

tratamento, como o frio, baixa de A_w , diminuição de pH e/ou aumento da concentração de sais (PHAN-THANH & GORMON, 1995; BECKER et al., 2000). Por essa razão, muitos testes devem ser realizados antes da padronização de um método de controle, a fim de se evitar que ocorra o aumento da resistência dos microrganismos ao invés de eliminá-los.

Quando se detecta a presença de *L. monocytogenes* em um alimento, é importante identificar os sorogrupos e sorotipos prevalentes, já que nem todos apresentam a mesma virulência e prevalência em surtos alimentares. Cepas de certos sorotipos (1/2c, 4a, 4c, 4d e 4e) raramente são isoladas de pacientes e podem constituir um baixo risco relativo para a listeriose humana. Da mesma forma, a presença do sorotipo 4b em alimentos prontos para o consumo, poderia ser causa para preocupação porque, embora não esteja normalmente presente nos alimentos, esse sorotipo tem sido envolvido em numerosos surtos. Cepas do sorotipo 1/2a contribuem substancialmente para a listeriose humana e também são freqüentemente encontradas em alimentos prontos para o consumo e em plantas de processamento. O conhecimento do risco oferecido por alimentos contaminados por cepas 1/2a é um desafio, pois esse sorotipo tem variação genética relativamente alta e a identificação de linhagens 1/2a que sejam predominantes em doenças de humanos ainda não foi alcançada (Kathariou, 2002).

No sistema PulseNet (Sharon R., disponível em: <<http://www.cdc.gov.pulsenet>>, acesso em 22/08/2006) estão sendo adicionadas informações sobre a tipificação de cepas isoladas em casos clínicos e em amostras de alimentos (Oliver, 2006).

A construção de bancos de dados ou bibliotecas de cepas (PulseNet ou equivalente) para patógenos de origem alimentar que possuísse a infraestrutura e os recursos necessários para fazer com que fosse realmente acessível a todos os microbiologistas do governo, da indústria e do setor acadêmico, apropriadamente treinados e equipados, facilitaria o monitoramento das contaminações em alimentos e no meio ambiente. Ao mesmo tempo facilitaria a comparação dos dados obtidos por cientistas entre os diferentes países, já que no Brasil diversos pesquisadores já trabalham no estudo genético de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de alimentos e

utilizam informalmente o protocolo estabelecido pelo programa PulseNet. Como esses dados não estão formalizados em uma plataforma eletrônica, muito pode estar sendo desperdiçado em informação do perfil genético de *L. monocytogenes* encontrada nos diferentes alimentos elaborados em nosso país.

Outra técnica que pode contribuir para uma rede de troca de dados genéticos é a análise decorrente da proteômica. Essa técnica identifica proteínas específicas de cepas ou linhagens com padrões únicos de expressão, definindo o momento exato da expressão, o que é condicionado por fatores externos ligados ao meio-ambiente bacteriano. Nesse caso podem-se considerar como interferentes a temperatura utilizada, ou mesmo fatores inerentes ao alimento (pH, atividade de água, potencial de oxi-redução).

A identificação rápida de microrganismos pode tornar-se mais específica quando métodos moleculares são utilizados. Um dos maiores desafios nas técnicas moleculares que utilizam a amplificação de ácidos nucléicos e que afetam a sensibilidade da reação é a presença de inibidores - tais como componentes da matriz alimentar -, os quais podem potencializar reações falso-positivas. Embora o enriquecimento das amostras seja necessário para se alcançar o limite de detecção desejado, os esforços contínuos na purificação do DNA-alvo irão facilitar o desenvolvimento de testes que ofereçam resultados quantificáveis em tempo real.

6 CONCLUSÕES

- A habilidade do *Agar Listeria According to Ottaviani and Agosti* (ALOA) para recuperar eficientemente *L. monocytogenes* injuriadas subletalmente pode ser muito útil para a enumeração direta de células injuriadas em certos tipos de alimentos processados (como por altas pressões) e contendo um nível de contaminação por *Listeria* acima da sensibilidade da técnica de plaqueamento direto ($>100 \text{ UFC.g}^{-1}$), inclusive a partir de uma matriz alimentar contendo diferentes organismos.
- A utilização do enriquecimento primário para o aumento do número de células de *L. monocytogenes* não é suficiente para detecção do microrganismo em amostras naturalmente contaminadas, porém a utilização do caldo de enriquecimento secundário testado impossibilitou o incremento do número de células de *L. monocytogenes* acima do limite de detecção do PCR em tempo Real, por causa da microbiota acompanhante. Em função desses fatores, a detecção pela metodologia tradicional de cultivo em placa foi mais eficiente que o protocolo de PCR utilizado. É necessário a intensificação de pesquisas visando otimizar as condições das etapas anteriores ao teste molecular.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARTS H.J., HAKEMULDER L.E., van HOEF A.M. Genomic typing of *Listeria monocytogenes* strains by automated laser fluorescence analysis of amplified fragment length polymorphism fingerprint patterns. **International Journal of Food Microbiology**, v.49, p. 95-102, 1999.

ABDULLATIF T., SHELLHAMMER T., YOUSEF A.E., CHISM W. Pressure death and tailing behavior of *Listeria monocytogenes* strains having different barotolerances. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 2057-2061, 2003.

AERTSEN A., De SPIGELEER P., VANOIRBEEK K., AVILLA M. MICHIELS C.W. Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p.2226-2231, 2005.

ALPA H., KALCHAYANAND N., BOZOGHI F., RAY B. Interaction of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure sensitive strains of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, p.33-42, 2000.

ARQUÉS J.L., RODRÍGUEZ E., GAYA P., MEDINA K., NUÑEZ, M. Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. **International Dairy Journal**, n. 15, p.893-900, 2005.

ART D., ANDRE P. Clinical and epidemiological aspects of listeriosis in Belgium, 1985-1990. **International Journal of Medical Microbiological, Virological, Parasitological and Infectious Disease**, v.275,p. 549-556, 1991.

AKEY DT, AKEY JM, ZANG K, JIN L. Assaying DNA methylation based on high-throughput melting curve approaches. **Genomics**, v.80, n.4, pp. 376-384, 2002.

AUTRET N., DUBAIL I., TRIEU-COUT P., BERCHE P., CHARBIT A. Identification of new genes involved in the virulence of *Listeria monocytogenes* by signature-tagged mutagenesis. **Infection Immunity**, v.69, p.2054-2065, 2001.

BARBOSA-CÁNOVAS G., POTHAKAMURY U.R., PALOU E., SWANSON B.G. **Conservación no térmica de alimentos**. Zaragoza: Acribia, 280p., 1998.

BARER M.R., HARWOOD C.R. Bacterial viability and culturability. **Advance in Microbiology and Physiology**, n.41, p.93-137, 1999.

BELL K., KYRIAKIDES A. **Listeria: Una aproximación práctica al microortanismo y su control en los alimentos**. Acribia: Zaragoza, 173p.,1998.

BECKER L.A., EVANS S.N., HUTKINS R.W., BENSON A.K. Role of sigma(B) in adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p.7083-7087, 2000.

BEN EMBAREK P.K. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. **Internationa Journal of Food microbiology**, v.23, p.17-34, 1994.

BEUCHAT L .R., BRACHETT R.E., HAO D.Y., CONNER D.E. Growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in cabbage and cabbage juice. **Canadian Journal of Microbiology**. n. 32, p.791-795. 1986.

BEUCHAT L.R. *Listeria monocytogenes*: incidende on vegetables. **Food Control**, v.7, p.223-228, 1996.

BIBB W.F., GELLIN B.G., WEAVER R., SCHWARTZ B., PLIKAYTIS B.D. REEVES M.W., PINNER R.W., BROOME C.V. Analysis of clinical and food-borne isolates of *Listeria monocytogenes* in the United Satates by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations. **Applied and Environmental microbiology**, v.56, p.2133-2141, 1990.

BIBB W.F., SCHWARTZ B. GELLIN B.G., PLIKAYTIS B.D., WEAVER R.E. Analysis of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme eletrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 8,p.233-239, 1989.

BORSCH R., CHEN J., LUCHANSKY B. Pulsed-field fingerprinting of listeriae: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, p.2584-2592, 1994.

BRUHN J.B., VOGEL B.F., GRAM L. Bias in the *Listeria monocytogenes* enrichment procedure: lineage 2 strains outcompete lineage 1 strains in University of Vermont Selective Enrichments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.23, p.961-967, 2005.

BUBET S., KÖHLER S. & GOEBEL W. The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, pp. 2625-2632, 1992.

BULL M.K., HYMAN M.M., STEWART C.M., SZABO F.A., KNABEL S.J. Effect of prior growth temperature, type of enrichment medium, and temperature and time of storage on recovery of *Listeria monocytogenes* following high pressure processing of milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, p.53-61, 2005.

CABRITA P., CORREIA S., FERREIRA-DIAS S., BRITO L. Genetic characterization of *Listeria monocytogenes* food isolates and pathogenic potential within serovars 1/2a and 1/2b. **Systematic and Applied Microbiology**, v.27, n.4, p.454-461, 2004.

CARLEZ A., ROSEC J.P., RICHARD N., CHEFTEL J.C. Bacterial growth during chilled storage of pressure treated mincemeat. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v.27, p.54, 1994.

CARRIARIE C., ALLARDET-SERVENT A., BOURG G., AUDURIER A., RAMUZ M. DNA polymorphism in strains of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.1351-1355, 1991.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Multistate outbreak of listeriosis – United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.49, p.1129-1130, 2000.

CHEFTEL J.C. Effects of high hydrostatic pressure on food macromolecules: an overview, **High Pressure and Biotechnology** (Hayashi R., Heremans K., Masson P. eds.), Colloque INSERM John Libbey Eurotext Ltd., v.224, p.195, 1992.

CHEN H., GUAN D., HOOVER D. Sensitivities of foodborne pathogens to pressure changes. **Journal of Food Protection**, v.69, p.130-136, 2006.

COSSART P., LECUIT K. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. **EMBO Journal**, v.17, p.3797-3806, 1998.

COX N.A., BAILEY J.S., BERRANG M.E. The presence of *Listeria monocytogenes* in the integrated poultry industry. **Journal of Applied Poultry Research**, v.6, p.116-119, 1997.

CURTIS G.D., LEE W.H. Culture media and methods for the isolation of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, p.1-13, 1995.

CZUPRYNSKY C.J., HAAK-FRENDSCHO M. Nonspecific resistance mechanisms to listeriosis: implications for experimental and naturally occurring infection. **Immunological Review**, v. 158, p.47-56, 1997.

DALTON CB, GREGORY J, KIRK MD, STAFFORD RJ, GIVNEY R, KRAA E, GOULD D: Foodborne disease outbreaks in Australia, 1995 to 200. **Communicable Diseases Intelligence**, v28,n2, pp.211-224, 2004.

DATTA N., HAYES M.G., DEETH H.C., KELLY A.L. Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenization on milk. **Journal of Dairy Research**, v.72, p.393-399, 2005.

DEPLACE G., MERTENS B. The commercial application of high pressure technology in the food processing industry. **High Pressure and Biotechnology** (Hayashi R., Heremans K., Masson P. eds.), Colloque INSERM Jonh Libbey Eurotext Ltd., v.224, p.469, 1992.

DISSURGET O, PIZARRO-CERDA & PASCALE COSSART. Molecular Determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. **Annual Review on Microbiology**, n.58, pp.567-610, 2004.

Dussugert O, Pizarro-Cerda & Cossart P. Molecular Determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. **Annual Review on Microbiology**, v.58, pp. 567-610, 2004

DOGAN C., ERKMEN O. High pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation in broth, milk, and peach and orange juices. **Journal of Food Engineering**, v. 62, p.47-52, 2004.

DONNELLY C.W. Detection and isolation of *Listeria monocytogenes* from food samples: implications of sublethal injury. **Journal of AOAC International**. v. 85, p.495-500, 2002.

DYKES G.A: Physical and metabolic causes of sub-lethal damage in *Listeria monocytogenes* after long-term chilled storage at 4°C. **Journal Applied Microbiology**, v.87. p. 915-922, 1999.

ERICSSON I.L., UNNERSTAD I.L., MATTSSON J.G., CANIELSSON-THAM M.L., THAM W. Molecular grouping of *Listeria monocytogenes* based on the sequence of the *inlB* gene. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, p.73-80, 2000.

EUGASIM E.A., KENNICK W.H. Effect of hydrostatic pressure on meat microstructure. **Food Microstructure**. v.1, p.75-82, 1982.

FARR D. High pressure technology in the food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v.1, p.14-16, 1990.

FRASIER J.A., SPERBER W.H. Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by aesculin hydrolysis. **Journal of Food Protection**, v.51, p.762-765, 1988.

FARBER J.M., PETERKIN P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiologic Review**, v.55, p.17-23, 1991.

FENG P. Impact of Molecular Biology on the Detection of Foodborne Pathogens. **Molecular Biotechnology**, v. 7, p.267-278, 1997.

FRANCIOSA G., MAUGLIANI A., FLORIDI F., AURELI P. Molecular and experimental virulence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from cases with invasive listeriosis and febrile gastroenteritis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.43, n.3, p.431-439, 2005.

GAILLARD J.L., BERCHE P., FREHEL C., GOUIN E., COSSART P. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. **Cell**, v.65, p.1127-1141, 1991.

GARCIA-GRAELLS C., VALCKZ C., MICHELS C.W. INACTIVATION of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in milk by combined treatment with high hydrostatic pressure and the lactoperoxidase system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p.4173-4179, 2000.

GARRIGA M., MARCOS B., MARTIN B., VACIANA-NOGUES M.T., BOVERCID S., HUGAS M., AYMERICH T. Starters cultures and high-pressure processing to improve the hygiene and safety of slightly fermented sausages. **Journal of Food Protection**, v.68, p.2341-2348, 2005.

GEOFFROY C., RAVENEAU J., BERETTI J.L., LECROISEY A., VAZQUEZ-BOLAND J.A. et al. Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. **Infection Immunity**, v.59, p.2382-2388, 1991.

GIOVANNANCI I., RAGIMBEAU C., QUEGUINER S., SALVAT G., VENDEUVRE J.L., CARLIER V., ERMEL G. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants. Use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.53, p.127-140, 1999.

GOLDFINE H., WADSWORTH S.J., JOHNSTON N.C. Activation of host phospholipases C and D in macrophages after infection with *Listeria monocytogenes*. **Infection Immunity**, v.68, p.5735-5741, 2000.

GRAVES L.M., SWAMINATHAN B., REEVES M.W., HUNTER S.B., WEAGER E. R. PLIKAYTIS B.C., SHUCHAT A. Comparision of ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis for subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. **Journal fo Clinical Microbiology**, v.32, p. 2936-2943, 1994.

GRAVES ,M., SWAMINATHAN B., REEVES M.W. HUNTER S.B., WEAVER E., PLIKAYTIS B.C., SCHUCHAT A. Comparision of ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis for subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 32, p.2936-2943, 1994.

GREIFFENBERG L, GOEBEL W, KIM KS, WEIGLEIN I, BUBERT A, ENGELBRECHT F, STINS M, KUHN M.: Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. **Infection Immunity**, v66, n11, pp.5260-5267, 1998

GRIFFITHS M.W. *Listeria monocytogenes*: its importance in the dairy industry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.47, p.133-158, 1989.

GRUNLING A., GONZALEZ M.D., HIGGINS, D.E. Requirement of the *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase PC-PLC during infection of human epithelial cells. **Journal of Bacteriology**, v.185, p.6295-6307, 2003.

HAYASHI R., KAWAMURA Y., KUNIGIS. Introduction of high pressure to food processing: preferential proteolysis of β -lactoglobulin in milk whey. **Journal of Food Science**, v.52, n.4, p.1107-1108, 1987.

HEDÉN C.G. Effects of high hydrostatic pressure on microbial systems. **Bacteriology Review**, v.28, p.14-29, 1964.

HEIN I, KLEIN D, LEHNER A, BUBERT A, BRANDL E, WAGNER M. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. **Research Microbiology**, v. 152, n.1, pp.37-46, 2001.

HIGUCHI R., FOKLE C., DOLLINGER G., WATSON R. Kinetic PCR analysis: Real time monitoring of DNA amplification reactions. **Biology and Technology**, v.11, p.1026-1030, 1993.

HOFFMAN A.D., WIEDMANN M. Comparative evaluation of culture- and BAX polymerase chain reaction-based detection methods for *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in environmental and raw fish samples. **Journal of Food Protection**. v.64, n.10, p.1521-1526, 2001.

HOLLAND P.M., ABRAMSON R.D., WATSON R., GELFAND D. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.88, p.7276-7280, 1991.

HOMMA N., IKEUCHI Y., SUZUKI A. Effect of high pressure treatment on the proteolytic enzymes in meat. **Meat Science**, v.38, p.219-228, 1994.

HOOVER D.G., METRICK C., PAPINEAU A.M., FARKAS F.D., KNORR D. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. **Food Technology**, v.43, p.99-107, 1989.

HOUGH, AJ, HARBISON SA, SAVILL MG, MELTON LD, FLETCHER G. Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v.65, n.8, pp.1329-1332, 2002.

ILSI RESEARCH FOUNDATION, RISK SCIENCE INSTITUTE: Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis – a risk-based approach. **Journal of Food Protection**, v.68, n9, pp.1932-1994, 2005.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). 5. **Microbiological Specification of Foods Pathogens**. Blackie Academic & Professional, London, 1996.

JACQUET C., DOUMITH M., BORDON J.I., MARTIN P.M., COSSART P., LECUIT M. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. **Journal of Infection Disease**, v.189, p. 2094-2100, 2004.

JACQUET C., GOUIN E., JAENNEL D., COSSART P., ROCOURT J. Expression of ActA, Ami, InlB and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.616-622, 2002.

JAENICKE R. Enzymes under extreme conditions. **Annual Review Biophysical Bioenergetic**, v10, p.1, 1981.

JAY J.M. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. **Food Control**, v.7, p.209-214, 1996.

JONQUIERES R., BIERNE H., FIEDLER F., GOUNON P., COSSART P. Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of gram-positive bacteria. **Molecular Microbiology**, v.34, p.902-914, 1998.

JOTHIKUMAR N, WANG X, GRIFFITHS MW. Real-time multiplex SYBR green I-based PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* serovars and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.66, n.11, pp.2141-2145, 2003.

KALCHAYANAND N., DUNNE P., SIKES A., RAY B. Viability loss and morphology change of foodborne pathogens following exposure to hydrostatic

pressures in the presence and absence of bacteriocins. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, p.91-98, 2004.

KALCHAYANAND N., SIKES T., DUNNE C.P., RAU B. Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.4174-4177, 1994.

KARATZAS K.A., BENNIK M.H. Characterization of a *Listeria monocytogenes* Sacott A isolate with high tolerance towards high hydrostatic pressure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p.3138-3139, 2002.

KITCHING J.A. Effects of high hydrostatic pressure on the activity of flagellates and ciliates. **Journal of Experimental Biology**, v. 34, p.494-510, 1957.

KOO K., JAYKUS L.A. Detection of *Listeria monocytogenes* from a model food by fluorescence resonance energy transfer-based PCR with an asymmetric fluorogenic probe set. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69,n.2, p.1082-1088, 2003.

KOHLER S, LIMEISTER-WACHTER M, CHAKRABORTY T, LOTTSPEICH F & GOEBER W. The gene coding for proteins p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, v.58, pp.1943-1950, 1990.

KOZAK J., BALMER T., GIREN R. et. al. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods:incidence in dairy products. **Food Control**, v. 7, p.215-221, 1996.

KUHNE BS, OSCHMANN P. Quantitative real-time RT-PCR using hybridization probes and imported standard curves for cytokine gene expression analysis. **Biotechniques**. n.33, v.5, pp.1080-1082, 2002.

LARSSON S. Epidemiology of listeriosis in Sweden 1958-1974. **Scanadian Journal of Infection Disease**, v.11, p.47-54, 1979.

LASA I., BOUIN E., GOETHALS M., VANCOMPERNOLLE K., DAVID V. et al. Identification of two regions on the N-terminal domain of ActA involved in the actin-comet tail formation by *Listeria monocytogenes*. **EMBO Journal**, v.16, p.1531-1540, 1997.

LEIMEISTER-WACHTER M., DOMMAN E., CHAKROBORTY T. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. **Journal of Bacteriology**, v.174, 1992.

LECUIT K., COSSART P. Genetically modified-animal models for human infections: the *Listeria* paradigm. **Trends in Molecular Medicine**, v.8, p.537-542, 2002.

LIND K, STAHLBERG A, ZORIC N, KUBISTA M. Combining sequence-specific probes and DNA binding dyes in real-time PCR for specific nucleic acid quantification and melting curve analysis. *Biotechniques*, v.40, n.3, pp.315-319, 2006.

LI Z.J., XU J.X. Effect of high hydrostatic pressure on microbial physiological characteristics. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v.45, p.521-525, 2005.

LONGHI C, MAFFEO A, PENTA M, PETRONE G, SEGANTI L, CONTE MP. Detection of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, n.5, pp.879-885, 2003.

MacGOWAN A.P., BOWKER K., McLAUHL J. et al. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop-bought foodstuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p.325-334, 1994.

MANZANO M., COCOLIN L., PIPAN C., FALASCA E., BOTTA G., CANTONI C. & COMI G. Single-stand conformation polymorphism (SSCP) análisis of *Listeria monocytogenes iap* gene as tool to detect different serogroups. **Molecular Cellular Probes**, v. 11, pp.459-462, 1997.

MASSON P. Pressure denaturation of proteins. . **High Pressure and Biotechnology** (Hayashi R., Heremans K., Masson P. eds.), Colloque INSERM Jonh Libbey Eurotext Ltd., v.224, p.89, 1992.

MARAKUSHA B.I., DARWICH K., TARTAKOVSKII S.I. Characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated in Russia and their typing using pulse electrophoreiss. **Journal of Microbiological and Epidemiological Immunobiology**, v.3, p.60-64, 1996.

MAZURIER S.L., AUDURIER A. MARQUET-Van der MEE, NOTERMANS S., WERNARS K. A comparative study of randomly amplified polymorphic DNA

analysis and conventional phage typing for epidemiological studies of *Listeria monocytogenes* isolates. **Researcha Microbiology**, v.143, p.507-512, 1992.

McBride M & GIRARD K. A selective method for the isolation of *Listeria monocytogenes* from mixed bacterial populations. **Journal of Laboratory Clinical Medicine**, n.55, pp.153-157, 1960.

McLAUCHILIN J. Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patientes with listeriosis. **European Journal of Clinical Microbiologic Disease**, v.9, p.210-213, 1990.

McLAUCHILIN J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. **Food Control**, v.7, p.187-193, 1996.

MENGAUD J., DRAMSI S., BOUIN E., VAZQUEZ-BOLAND J.A., KILON G., COSSART P. Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. **Molecular Microbiology**, v.5, p.2273-2283, 1991.

MENGAUD J., OHAYON H., GOUNON P., MEGE R.-M., COSSART P. E-Caderin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. **Cell**. v.84, p.923-932, 1996.

MENGAUD J, VICENTE M, CHENEVERT J, PEREIRA J., GEOFFROY C, GICQUEL-SANZEY B, BAQUERO F, PEREZ-DIAZ & COSSART P. Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria moncytogenes*. **Infection and Immunity**, v.56, pp.766-772f, 1988.

MIGNACO J.A., KIMA L.M., ROSENTHAL A., FOGUEL D., SILVA J.L. Highlights of the 3rd International Conference o High Pressure Bioscience and Biotechnology. **Brazilian Journal of Medicine Biological Research**, v.38, p.1147-1155, 2005.

MILLER A.J., SMITH J.L., SOMKUTI G.A: **Topics in Industrial Microbiology: Foodborne Listeriosis**. Eastern Regional Research Center, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Philadelphia, PA, USA. Elsevier: Amsterdam- New York- Oxford, chapt. 14, p. 81-219, 1990.
MILOHANIC E, JONQUIERES R, GLASSER P, DEHOUS P, JACQUET C, BERCHE P, COSSART P, BAILLARD JL: Sequence and binding activity of the autolysin-adhesin Ami from epidemic *Listeria monocytogenes* 4b. **Infection Immunity**, v72, n8, pp.4401-4409, 2004.

MOORE M.A., DATTA A.R. DNA fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains by pulsed-field gel eletrophoresis. **Food Microbiology**, v.11, p.31-38, 1994.

MORGAN G., De COPPET, BOURION F., RACHMAN C., PRÉVOST H., DOUSSET X. Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* in Biofilms by Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.2190-2194, 2005.

MORGAN S.M., ROSS R.P., BERESFORD T., HILL C. Combination of hydrostatic pressure and lacticin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*. **Jounal of Applied Microbiology**, v. 88, p.414-420, 2000.

MORITA R.Y. Effect of hydrostatic pressure on succinic, malic and formic dehydrogenases in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.74, p.251-255, 1957.

MORRIS E.C., High pressure builds up. **Food Engineering** , Oct., p.113-120, 1993.

NELSON C.M., SHUPPENHAUER M.R.& CLARK D.S. High-pressure, high-temperature bioreactor for comparing effects of hyperbaric and hydrostatic pressure on bacterial growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.1786-1793, 1992.

NIEDERHAUSER C., HOFELIN C., ALLMANN M. BURKHALTER P. LUTHY J., CANDRIAN U. Random amplification of polymorphic bacterial DNA: evaluation of 11 oligonucleotides and application to food contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.77, p.574-582, 1994.

NIESTES H. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. **Methods**, v. 25, p.414-429, 2001.

NORWOOD D.E., GILMOUR A. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.576-582, 1999.

NOVAK J.S., JUNEJA V. Detection of heat injury in *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Food Microbiology**, v.64, n.11, p.1739-1743, 2001.

NUTIU R, LI Y. Tripartite molecular beacons. **Nucleic Acid Research**, v. 30, pp. e94 (1-9), 2002.

OJENIYI B., CHRISTIANSEN J., BISGAARD M. Comparative investigations of *Listeria monocytogenes* isolated from a turkey processing plant, turkey products and from human cases of listeriosis in Denmark. **Epidemiology and Infection**, v.125, p.303-308, 2000.

OJENIYI B., WEGENER C., JENSEN N., BISGAARD M. *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiological investigations in seven Danish abattoirs. **Journal of Applied Bacteriology**, v.80, p.395-401, 1996.

OLIER M., PIERRE F., ROUSSEAU S., LEMAITRE J.P., ROUSSET A., PIVETEAU P., BUZAP J. Expression of truncated Internalin A is involved in impaired internalization of some *Listeria monocytogenes* isolates carried asymptotically by humans. **Infection Immunity**, v. 71, n.3, p.1217-1224, 2003.

OLIVER S. National and International PulseNet Network – Editorial -. **Foodborne Pathogen dan Disease**. V.3,n.1, 2006.

OTTAVIANI F., OTTAVIANI M., AGOSTI M. Esperienza su um Agar selettivo e differenziale per *Listeria monocytogenes*. **Industria Alimentaria**. v.36, p. 888-895, 1998.

PATEL H.A., SINGH H., HAVEA P., CONSIDINE T., CREAMER L.K. Pressure-induced unfolding and aggregation of the proteins in whey protein concentrate solutions. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.53, p.9590-9601, 2005.

PHAN-THANH L., GORMON T., Analysis of heat and cold shock proteins in *Listeria* by two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v.3, p.444-450, 1995.

PIFFARETTI J.C., DRESSEBUCH H., AESCHBACHER M., BILLE J., BANNERMAN E., MUSSER J.M., SELANDER R.K. ROCCOURT J. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.86, p.3818-3822, 1989.

PORTNOY D.A., JACKS P.S., GHINRICHS D.J. Role of hemoocin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Experimental Medicine**, v.167, p.1459-1471, 1988.

RITZ M., THOLOZAN J.L., FEDERIGHI M., PILET AM.F. Physiological damages of *Listeria monocytogenes* treated by high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, p.47-53, 2002.

ROCOURT J. *Listeria monocytogenes*: The state of the science. **Dairy, Food and Environment Sanitation**, v.14, n.2, p.70-82, 1994.

ROCOURT J. Risk factor of listeriosis. **Food Control**, v.7, p.195-202, 1996.

RODRIGUEZ E., ARQUES J.L., NUNEZ M. BAYA P., MEDINA M. Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in raw-milk cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p.3399-3404, 2005.

RODRIGUEZ-LAZARO D, JOFRE A, AYMERICH T, HUGAS M, PLA M. Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**. v.70, n.10, pp.6299-301, 2004.

RUDI K., NOGVA H.K., NATERSTAD K., DROMTORP S.M., BREDHOLT S., HOLCK A. Subtyping *Listeria monocytogenes* through the combined analyses of genotype and expression of the hlyA virulence determinant. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, n.4, p.720-732, 2003.

RYSER E.T., ARIMI S.M., BUNDUKI M.-C, DONNELLY C.W. Recovery of different *Listeria* ribotypes from naturally contaminated, raw refrigerated meat and poultry products with two primary enrichment media. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.1781-1787, 1996.

RYSER E.T., MARTH E.H. ***Listeria*, listeriosis and food safety**. Marcel Dekker Incorporation: New York, 1999.

SACCHETTI R, BIANUCCI F, AMBROGIANI E. Detection of *Listeria monocytogenes* in foodstuffs using chromogenic isolation media. **New Microbiology**, v.26, n.3, pp.269-274, 2003.

SCHRANK I.S., SILVA S.C. Replicação do DNA. IN: ZAHA A. (Coord.) *Biologia Molecular Básica*. Porto Alegre: Mercado Aberto, p.93-115, 2001.

SHARON R. Disponível em :<<http://www.cdc.gov.pulsenet>>, acesso em 22/08/2006.

SOINI S.M., KOSKINEN K.T., VILENIUS M.J., PUHAKKA J.A. Effects of high and fluctuating pressure on microbial abundance and activity in a water hydraulic system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.58, p.669-674, 2002.

STRATAGENE MANUAL. **Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix – Instruction Manual**: <http://www.stratagene.com/manuals/600548.pdf>. Acessado em 21/03/2006.

STYLES M.F., HOOVER, D.G., FARKAS D.F. Response o *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. **Journal of Food Science**, v.56, p.1404-1407, 1991.

SUZUKI C., SUZUKI K. The gelation of ovoalbumin solutions by high pressure. *Achivos in Biochemistry and Biophysic*, v.102, n.3, p367, 1963.

TAY A, SHELLHAMMER T, YOUSEF A, CHISM G. Pressure death and tailing behavior of *Listeria monocytogenes* strains having different barotolerances. **Journal of Food Protection**. n.66, v.11, pp.2057-2061, 2003.

TEO IA, CHOI JW, MORLESE J, TAYLOR G, SHAUNAK S. LightCycler qPCR optimisation for low copy number target DNA. **Journal of Immunological Methods**, v.271, n.1, pp. 119-133, 2002.

TYAGI S., KRAMER F. Molecular beacons: Probes that fluoresce uupon hibridization. **Natural Biotechnology**, v.14, p.303-338, 1996.

Van der ZEE A., GROENENDIJK M., PEETERS M., MOOI R. The differentiation of *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* from humans and animals as determined by DNA polymorphism mediated by two different insertion sequence elements suggests their phylogenitic relationship. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, p.640-647, 1996.

VLAEMINCK G., LAFARGE V., SCOTTER S. Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic chromogenic isolation medium. **Journal Applied Microbiology**, v. 88 p.430-441, 2000.

VON LAER A, LIMA A, TRINDADE P, SILVA W. Monitoramento de *Listeria monocytogenes* em planta de processamento de lingüiça mista frescal localizada em Pelotas. Revista Brasileira de Vigilância Sanitária, v.1, n.3, pp. 192-198, 2005.

VURMA M., CHUNG Y.K., SHELLHAMMER T.H., TUREK E.J., YOUSEF A.E. Use of phenolic compounds for sensitizing *Listeria monocytogenes* to high-pressure processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p.263-269, 2006.

WEMEKAMP-KAMPHUIS H.H., KARATZAS A.K., WAUTERS J.A., ABEE T. Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure. **Applied and environmental Microbiology**, v. 68, p.456-463, 2002.

WIEDMAN M., BRUCE J., KEATING C., JOHNSON A., McDONOUGH P., BATT C. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. **Infection and Immunity**, v.65, p.2707-2716, 1997.

WOOD D. Isolation of *Listeria monocytogenes*, in Isolation Methods for Microbiologists. Society for Applied Bacteriology, Technical Series n.3, Academic Press, London, pp.63-69, 1969.

WUYTACK E.Y., PHUONG L.D., AERTSEN A., REYNS K.M., MARGUENIE D., De KETELAERE B., MASSCHALCK B., Van OPSTAL I., DIELS A.M., MICHELIS C.W. Comparisios of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. **Journal of Food Protection**, v.66, p.31-37, 2003.

WU V.C., FUNG D.Y., KANG D.H., THOMPSON L.K. Evaluation of thin agar layer method for recovery of acid-injured foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, n. 64, p. 1067-1071, 2001.

ZIMMERMAN F., BERGMAN C. Isostatic pressure equipment for food presenvation. **Food Techology**, v.47, n.6, p.162-163, 1993.

ZOBELL C. Pressure effects on morpholoty and life precesses of bacteria, High pressure effects on cellular processes. A.M. Zimmerman: New York, 1970.