



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

CLARISSA BARRETTA

**DETECÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM PRODUTOS
A BASE DE PESCADO E COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE
PCR EM TEMPO REAL E ISO11290-1**

**FLORIANÓPOLIS/SC
2015**

CLARISSA BARRETTA

**DETECÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM PRODUTOS
A BASE DE PESCADO E COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE
PCR EM TEMPO REAL E ISO11290-1**

Dissertação submetida à banca examinadora como requisito para obtenção de grau de mestre em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cleide Rosana Werneck Vieira

**Florianópolis
2015**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Barretta, Clarissa

Detecção de *Listeria Monocytogenes* em Produtos a Base de Pescado e Comparação de Métodos de PCR em Tempo Real e ISO11290-1 / Clarissa Barretta ; orientadora, Cleide Rosana Wemeck Vieira – Florianópolis, SC, 2015.

113 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciências dos Alimentos. 2. *L. monocytogenes*. 3. PCR em tempo real. 4. produtos a base de pescado. 5. produtos prontos para o consumo. I. Vieira, Cleide Rosana Wemeck. II. Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

**DETECÇÃO DE LISTERIA MONOCYTOGENES EM
PRODUTOS A BASE DE PESCADO PRONTOS PARA O
CONSUMO ATRAVES DE PCR REAL TIME**

Por

Clarissa Barreta

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “**Mestre** em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 06 de março de 2015.

Prof^ª. Dr^ª. Roseane Fett
Coordenador

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Cleide Rosana Werneck Vieira,
Orientador (UFSC)

Prof^ª. Dr^ª. Cristhiane Stecanella de Oliveira Cattani,
Membro (MAPA)

Prof^ª. Dr^ª. Juliano de Dea Lindener
Membro (UFSC)

Prof^ª. Dr^ª. Elane Schwinden Prudêncio
Membro (UFSC)

A minha família, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por me dar forças todos os dias para batalhar pelos meus sonhos.

A minha família... meu pai Nilton Angelo Barretta que, mesmo sem compreender minhas decisões, não hesitou em me apoiar sempre... minha mãe Ivete Maria Barretta... minha grande incentivadora... obrigada por tudo, por existir e ser essa mãe incrível... você é a grande responsável pela realização desse sonho... Meu irmão Anderson... meu grande amigo e companheiro... pelas horas alegres que passamos juntos e por me ouvir e apoiar sempre... Minha irmã Claiza Barretta La Bella por ser minha melhor amiga, pelo apoio, colaboração profissional e pelo ombro amigo em tantos momentos... Minha amada afilhada Ana Júlia... meu presentinho de Deus... sua chegada transformou nossas vidas, nos fazendo muito mais felizes... obrigada por existir e ser essa criança meiga e alegre!! Meus cunhados Andressa Dalla Costa Barretta e Gustavo La Bella pela amizade, parceria e apoio...amo muito todos vocês!!

A minha Meg... minha estrelinha no céu...tua partida durante a realização deste projeto me trouxe muita tristeza... mas tua presença na minha vida por 13 anos me fez muito feliz! Obrigada por ter existido e me ensinado tanto!! Te amarei para sempre!

Ao meu amor Marcelo... pelo apoio, incentivo, pela paciência nos momentos difíceis, pelo ombro amigo e por sonhar comigo esse sonho! A toda família Sucolotti Gastmann pelas palavras de incentivo.

Agradeço a professora Cleide Rosana Werneck Vieira pela confiança, orientação, amizade e parceria durante o mestrado. Muitas realizações ainda teremos juntas, com certeza!

Ao professor Antônio Augusto Fonseca Júnior pela ajuda, parceria e paciência durante esse período. Á equipe do Lanagro Pedro Leopoldo pela oportunidade e pela ajuda prestada.

Aos membros da banca Cristhiane Cattani, Elane Schwinden Prudêncio e Juliano De Dea Lindner pela importante contribuição e parceria.

A querida Daiane Bobermin pela imensa ajuda nos ensaios laboratoriais, pela parceria e amizade.

Aos amigos do laboratório, pela troca de experiência, parceria, amizade... por tantos momentos alegres e por estarem ao meu lado sempre: Helen Silvestre, Marília Miotto, Karin Medeiros, Priscila Cortina, Simone Moraes Raszl e Norton Komora. Em especial a Helen Silvestre pela ajuda em todos os momentos de dificuldade.

Aos amigos do Laboratório de extensão pela contribuição e amizade.

Aos amigos do departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos que fizeram parte da rotina de trabalho, tornando-a mais agradável.

Ao povo brasileiro, que através do CNPq, financiou minha bolsa de mestrado.

*“Aprender é a única coisa que a mente
nunca se cansa, nunca tem medo e nunca
se arrepende.”*

Leonardo da Vinci

RESUMO

O pescado é um alimento de extrema importância na dieta dos seres humanos, pois possui um alto valor nutricional, contribuindo na preservação da saúde humana. Porém, esses alimentos, principalmente os produtos a base de pescados prontos ou pré-prontos para o consumo, quando indevidamente preparados, podem se tornar veículo de transmissão de perigosos agentes infecciosos, como *Listeria monocytogenes*. Esse micro-organismo, que é natural do ambiente marinho, é considerado como agente etiológico de enfermidades alimentares representa um risco potencial para a saúde dos consumidores, principalmente mulheres gestantes, pessoas idosas e imunodeprimidos. As análises convencionais para detecção de *L. monocytogenes* nestes produtos, como a ISO 11290-1, apesar de ainda muito utilizadas no Brasil, são técnicas laboriosas, demoradas e de sensibilidade reduzida. Os métodos moleculares atuais, como o PCR em tempo real, por exemplo, são extremamente sensíveis, rápidos e eficientes para a detecção de patógenos alimentares. Com base nisso, esse estudo teve como objetivo detectar a presença de *L. monocytogenes* em amostras de produto a base de pescado através de dois protocolos distintos (utilizando um kit comercial e um protocolo *in house*) de uma técnica molecular: o PCR em tempo real. Os resultados foram comparados aos obtidos com a técnica convencional ISO 11290-1. Foram analisadas, ao todo, noventa amostras de produtos a base de pescados vendidos nos supermercados do litoral de Santa Catarina. As amostras incluíram nove tipos de produtos de pescado, sendo eles: 10 amostras de pizza de atum, 10 amostras de kani, 10 amostras de bolinho de bacalhau, 10 amostras de bolinho de peixe, 10 amostras de hambúrguer de peixe, 10 amostras de filé de peixe, 10 amostras de marisco cozido, 10 amostras de nuggets de merluza e 10 amostras de nuggets kids. Foi detectada a presença de *L. monocytogenes* em oito amostras (8,88%) pelo protocolo PCR em tempo real *in house*, sete amostras (7,77%) pelo protocolo PCR em tempo real com kit comercial e seis amostras (6,66%) pela técnica ISO 11290-1. Os produtos que tiveram amostras positivas foram: pizza de atum, bolinho de bacalhau, bolinho de peixe e filé de peixe. Os resultados demonstraram uma elevada incidência de *L. monocytogenes* nos produtos a base de pescados pesquisados, além de indicar uma maior sensibilidade da metodologia molecular comparada à metodologia convencional, sendo que o protocolo *in house* da técnica de PCR em tempo real foi o mais

sensível, mesmo não apresentando diferença significativa estatisticamente.

Palavras-chave: *L. monocytogenes*, PCR em tempo real, produtos a base de pescado, produtos prontos para o consumo.

ABSTRACT

Seafood are an extremely important food in the human diet, due to its high nutritional value, contributing to the preservation of human health. However, these foods, especially ready to eat (RTE) fish-based products or pre-prepared could become dangerous vehicle for infectious agents such as *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), when incorrectly prepared. This micro-organism is considered as the etiological agent of food illnesses with high potential risk to the consumers health, especially pregnant women, elderly and immunocompromised. Conventional methods for *L. monocytogenes* in these products, such as ISO 11290-1, still widely used in Brazil, has laborious, high time consuming and reduced sensitivity. Current molecular techniques, such as real-time PCR, for example, are extremely sensitive, fast and effective for the detection of foodborne pathogens. On that basis, this study aimed to detect the presence of *L. monocytogenes* in fish-based product sample using two different protocols (application of commercial kit and protocol in house) of a molecular technique: the real-time PCR. The results were compared to those obtained with the conventional technique according to ISO 11290-1. There were analyzed ninety samples of the fish-based products sold in supermarkets from the coast of Santa Catarina. The samples included nine types of fish products, which were: ten samples of tuna pizza, ten samples of kani, ten samples of codfish balls, ten samples of fish dumpling, ten samples of fish burger, ten samples of fish fillet, ten samples of baked seafood, ten samples of hake nuggets and ten samples of nuggets kids. *L. monocytogenes* was detected in eight samples (8.88%) by real-time PCR protocol in house, in seven samples (7.77%) by real time PCR protocol with a commercial kit and in six samples (6.66%) by ISO 11290-1 technique. The products which had positive samples were tuna pizza, codfish balls, fish fillet and fish balls. The results showed a high incidence of *L. monocytogenes* in fish-based products, and indicate an increased sensitivity of PCR analysis compared to conventional methodology, and the protocol in house of the real-time PCR assay technique was the most sensitive, despite not having statistically significant difference.

Keywords: *L. monocytogenes*, Real-time PCR, Seafood products; Ready to eat products;

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Ciclo de vida intracelular da <i>L. monocytogenes</i>	40
Figura 02: Diferenças morfológicas das colônias de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Listeria ivanovii</i> no Agar ALOA.....	50
Figura 03: Inoculação e interpretação de placas de CAMP teste.....	51
Figura 04: Comparação da incidência de <i>L. monocytogenes</i> por tipo de produto nos métodos ISO 11290-1, PCR em tempo real por kit comercial e PCR em tempo real <i>in house</i>	96
Figura 05: Amostras positivas nos métodos ISO 11290-1, PCR em tempo real por kit comercial e PCR em tempo real <i>in house</i>	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Espécies de <i>Listeria</i> e capacidade de virulência em humanos e animais.....	35
Tabela 02: Critérios microbiológicos para <i>L. monocytogenes</i> em produtos alimentares prontos para o consumo, incluindo frutos do mar.....	44
Tabela 03: Produtos do mar implicados em surtos de listeriose humana.....	47
Tabela 04: Descrição do tipo de produtos e quantidade de amostras coletadas.....	80
Tabela 05: Volume das soluções por litro de meio base para a suplementação dos caldos de enriquecimento para <i>Listeria</i>	80
Tabela 06: Reações para identificação de <i>Listeria spp</i>	84
Tabela 07: <i>Primers</i> e sonda utilizados no ensaio de PCR em tempo real <i>in house</i>	87
Tabela 08: Nível de concordância para os valores de Kappa.....	89
Tabela 09: Número de amostras e tipo de produtos que tiveram colônias suspeitas nos meios ALOA e LSA.....	90
Tabela 10: Amostras suspeitas, com colônias típicas e análises de confirmação para <i>L. monocytogenes</i>	91
Tabela 11: Número da amostra, tipo de produto e seus respectivos Cts obtidos na amplificação pelo método de PCR em tempo real por uso de kit comercial.....	92
Tabela 12: Número da amostra, tipo de produto e seus respectivos Cts obtidos na amplificação pelo método de PCR <i>in house</i>	94

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
1 Produção e consumo de pescado no mundo.....	31
2 Produção e consumo de pescado no Brasil.....	31
3 Doenças veiculadas por alimentos (DVAs).....	32
4 Doenças veiculadas por alimentos (DVAs) através de pescado.....	32
5 <i>Listeria</i>	33
6 <i>Listeria monocytogenes</i>	35
6.1 Características do agente.....	36
6.2 Listeriose.....	37
6.3 Mecanismos de patogenicidade.....	38
6.3.1 Gene de virulência <i>hly</i>	41
6.4 Dose infectante.....	41
6.5 Alimentos envolvidos.....	42
6.6 Legislação e parâmetros para <i>Listeria monocytogenes</i> no mundo...43	
6.7 Incidência de <i>Listeria monocytogenes</i> no Brasil e no mundo.....	45
6.8 Incidência de <i>Listeria monocytogenes</i> em produtos de pescado.....	46
7 Métodos de detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos.....	48
7.1 Métodos convencionais para detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	49
7.1.1 ISO 11290-1.....	49
7.2 Métodos moleculares para detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> em produtos de pescado.....	52
7.2.1 PCR.....	52
7.2.1.1 Extração de DNA.....	53
7.2.1.2 PCR em tempo real.....	54
8 REFERÊNCIAS.....	57
3 CAPÍTULO II: DETECÇÃO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> EM PRODUTOS A BASE DE PESCADO E COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE PCR EM TEMPO REAL E ISO11290-1.....	75
1 INTRODUÇÃO.....	77
2 OBJETIVOS.....	79
2.1 Objetivo Geral.....	79
2.2 Objetivos Específicos.....	79
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	79
3.1 Amostras.....	79
3.2 Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> através da metodologia ISO 11290-1.....	80
3.2.1 Enriquecimento seletivo primário.....	80

3.2.2	Enriquecimento seletivo secundário.....	81
3.2.3	Plaqueamento seletivo.....	81
3.2.4	Leitura e triagem de colônias típicas.....	81
3.2.5	Confirmação de <i>Listeria spp.</i>	82
3.2.5.1	Reação de catalase.....	82
3.2.5.2	Coloração de Gram.....	82
3.2.5.3	Teste de motilidade.....	82
3.2.6	Confirmação de <i>Listeria monocytogenes</i>	82
3.2.6.1	Teste de hemólise.....	82
3.2.6.2	Utilização de carboidratos.....	83
3.2.6.3	CAMP teste.....	83
3.2.7	Expressão de resultados.....	85
3.3	Deteção de <i>L. monocytogenes</i> através da metodologia de PCR em tempo real.....	85
3.3.1	Preparo das amostras.....	85
3.3.2	Extração do DNA genômico.....	85
3.3.3	PCR em tempo real.....	85
3.3.4	Protocolo de PCR em tempo real através de uso de kit comercial Mericon <i>Listeria monocytogenes</i> Kit® (Qiagen).....	86
3.3.4.1	Teste preliminar.....	86
3.3.4.2	Preparo do mix.....	86
3.3.4.3	Condições da PCR.....	86
3.3.5	Protocolo de PCR em tempo real <i>in house</i>	87
3.3.5.1	<i>Primers</i> e sonda.....	87
3.3.5.2	Preparo do mix.....	86
3.3.5.3	Condições da PCR.....	88
3.3.6	Expressão dos resultados.....	88
3.4	Análise estatística dos dados.....	88
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
4.1	Deteção de <i>L. monocytogenes</i> através da metodologia ISO 11290-1.....	87
4.2	Deteção de <i>L. monocytogenes</i> através da metodologia de PCR em tempo real.....	92
4.2.1	Protocolo de PCR em tempo real através de uso de kit comercial Mericon <i>Listeria monocytogenes</i> Kit® (Qiagen).....	92
4.2.2	Protocolo de PCR em tempo real <i>in house</i>.....	93
4.3	Prevalência de <i>Listeria monocytogenes</i> nos produtos testados pelos métodos de PCR em tempo real e ISO 11290-1.....	95
4.4	Comparação entre os Protocolos de PCR em tempo real e a metodologia ISO 11290-1.....	98

4.4.1 Comparação dos valores de Cts entre os protocolos de PCR em tempo real.....	100
5 CONCLUSÕES.....	103
6 REFERÊNCIAS.....	105

INTRODUÇÃO

O consumo de peixes e frutos do mar vem aumentando nas últimas quatro décadas no mundo, tanto pela maior demanda quanto pelas mudanças no hábito alimentar da população, que vem, cada vez mais, buscando produtos com perfil nutricional adequado. Estima-se que o atual consumo de peixe per capita seja de mais de 19 kg por ano (FAO, 2013).

A produção e comércio mundial de frutos do mar também têm apresentado um crescimento contínuo ao longo dos últimos 60 anos. As importações mundiais de produtos marinhos comestíveis, por exemplo, aumentaram de 1,0 milhão de toneladas em 1979 para 2,3 milhões de toneladas em 2009. Há também uma grande variedade de espécies de frutos do mar disponíveis no mercado global, com 25 grandes grupos de espécies contabilizadas em todo o mundo e cerca 1.700 espécies de peixes comerciais nomeado pelo FDA (Food and Drug Administration) (HELLBERG; MORRISSEY, 2011).

Frutos do mar são uma excelente fonte de proteína de alta qualidade e contém lipídios com altos níveis de ácidos graxos insaturados, que são requeridas para reduzir o risco de doença cardiovascular. Além disso, esses produtos são de fácil digestão, além de uma boa fonte de muitas vitaminas e minerais (GAMBARIN et al., 2012).

O acesso a alimentos seguros e de boa qualidade é uma das condições essenciais para a promoção e manutenção da saúde humana, além de contribuir para o aumento da produtividade e o bem estar das pessoas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). As doenças de origem alimentar influenciam a vida de milhões de pessoas e causam prejuízos econômicos significativos, envolvendo custos com tratamentos médicos, salários, negócios desfeitos, alimentos descartados e despesas associadas com a limpeza das instalações das indústrias alimentícias (NEAL, 2013).

No entanto, a produção e a industrialização de alimentos isentos de bactérias patogênicas se tornam difíceis na prática, mesmo com a aplicação das Boas Práticas de Fabricação e dos Procedimentos Padrão de Higiene Operacional nas indústrias de alimentos, que são as bases essenciais da segurança da qualidade para programas como APPCC (Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle) (SALLES et al., 2002).

Produtos de pescado desencadeiam frequentemente alertas de regulação nos países importadores. O Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações (RASFF) da União Européia (EU) indica que, em comparação com outras categorias de produtos alimentícios, esta categoria é a segunda mais frequente no número de alertas ativados entre 2009 e 2012. Rejeições de produtos de pesca respondem por aproximadamente 15% do total de rejeições de produtos em 2012 pelo RASFF. A bactéria *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) provocou a retenção do produto em 4% dos casos registrados em todo o mundo (ANONYMOUS 2013; NORHANA et al., 2010).

L. monocytogenes é um agente patogênico de origem alimentar que está amplamente distribuído no ambiente e ocorre naturalmente em muitos alimentos crus. Esta é considerada uma bactéria importante dentro do grupo de micro-organismos capazes de causar doenças veiculadas por alimentos, através do consumo de pescados (GONÇALVES, 2011).

Ao longo das últimas três décadas, a crescente preocupação com *L. monocytogenes* e seu papel na segurança alimentar foi estabelecida em todo o mundo. Surtos causados por este agente são relatados em países em desenvolvimento, bem como em países desenvolvidos (DE CASTRO et al., 2012). A listeriose é descrita como a responsável por cerca de 1.600 casos doenças transmitidas por alimentos, 1.500 hospitalizações e 260 mortes anualmente nos EUA (SCALLAN et al., 2011).

O consumo de produtos alimentares contaminados com *L. monocytogenes* provoca uma gama de manifestações clínicas incluindo septicemia, meningite, gastroenterite e aborto, com um valor aproximado de 20% de taxa de letalidade, sendo que, em grupos de alto risco, como mulheres grávidas, idosos e adultos imunocomprometidos a taxa de letalidade aumenta para até 75% (FRETZ et al., 2009).

A ampla distribuição desse micro-organismo no ambiente, combinado com as diversas condições de crescimento do patógeno parecem ser as principais causas de sua forte capacidade de proliferação em diferentes tipos de produtos alimentares, incluindo queijo, leite cru, sorvete, carne, peixe e alimentos prontos para o consumo (PESAVENTO et al., 2010). A contaminação de produtos por *L. monocytogenes*, portanto, tem um impacto significativo sobre o comércio internacional de frutos do mar, causando perdas financeiras diretas e indiretas, podendo reduzir a vida de prateleira do produto e apresentar altos custos associados à *recalls* de produtos (NORHANA et al., 2010).

No Brasil, o Ministério da Agricultura (MAPA), em 2009, por meio da Instrução Normativa nº9, instituiu procedimentos de controle de *L. monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo (BRASIL, 2009). Coletas oficiais de produtos prontos e pré-prontos para o consumo nas indústrias de pescado do país vem sendo realizadas desde agosto de dois mil e treze pelo MAPA, a fim de obter um panorama da situação atual e prevenir possíveis problemas de saúde pública associados ao consumo de produtos de pescado contaminados com *L. monocytogenes*.

A legislação brasileira, no entanto, ainda não define parâmetros microbiológicos para *L. monocytogenes* em produtos de pescado. A maioria dos países possui tolerância zero para a presença de *L. monocytogenes* em certos alimentos para consumo humano, assim se torna ainda mais importante possuir testes rápidos com alta sensibilidade a disposição.

Os países europeus, por exemplo, possuem regulamentação para *L. monocytogenes* em produtos prontos para o consumo estabelecendo o valor máximo de 100 UFC/grama por amostra, durante a vida de prateleira (EC 1441/2007). O Canadá também determina esse mesmo valor como máximo em produtos enquadrados como de baixo risco (HEALTH CANADA, 2011). Já a legislação americana define como ilegal a venda de produtos prontos para o consumo contaminados com qualquer quantidade de *L. monocytogenes* (FDA, 2011).

Além disso, os métodos analíticos utilizados atualmente para a detecção de patógenos bacterianos em alimentos no Brasil ainda é o cultivo convencional seguindo protocolos padronizados (como a metodologia ISO 11290-1). Estes métodos, no entanto, são demorados e não fornecem informações rápidas e precisas sobre contaminações de alimentos e, portanto, são limitados em sua capacidade de proteger os consumidores de potenciais riscos microbianos (ROHDE et al., 2015). O extenso tempo necessário para emissão de um resultado definitivo traz prejuízos também a indústria, em função da necessidade de liberação dos produtos perecíveis no mercado antes da sua data de validade.

Segundo Gasanov et al. (2005), a identificação de *L. monocytogenes* através de métodos moleculares está se tornando cada vez mais popular em todo mundo, pois estas técnicas são extremamente rápidas, precisas, sensíveis e específicas. Uma das técnicas moleculares utilizada para a detecção de *L. monocytogenes* em alimentos é o PCR em tempo real, sendo que as principais vantagens dessa técnica são:

elevada sensibilidade e especificidade e excelente eficiência (CHUANG et al., 2012).

A utilização de métodos rápidos e mais confiáveis traz benefícios a toda cadeia produtiva de pescado, principalmente ao consumidor final. Dessa forma, pesquisas sobre a ocorrência de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo tornou-se cada vez mais importante, sobretudo tendo em conta que os produtos envolvidos nos surtos e casos esporádicos de listeriose são predominantemente alimentos processados refrigerados e com longa vida de prateleira (BENETTI et al., 2012).

Além disso, embora *L. monocytogenes* seja amplamente estudada, os dados da literatura são bastante escassos quanto a sua ocorrência em produtos de pescado, o que também motivou a realização deste trabalho.

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Produção e consumo de pescado no mundo

O consumo de pescados aumentou recentemente devido ao aumento da conscientização dos consumidores sobre nutrição e alimentação de qualidade (GHANBARI et al., 2013). Pescados representam importantes fontes de proteínas na alimentação do ser humano, apresentam alta qualidade nutricional e alta digestibilidade, com quantidade de proteína semelhante às encontradas nas carnes bovina e de frango. Além disso, os valores encontrados para vitamina A, cálcio e fósforo são superiores na carne de peixe, quando comparados com a carne bovina e de frango (OSTRENSKY et al., 2008).

A FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) estima que a pesca e a aquicultura são o sustento de 10 a 12% da população mundial. Nos países insulares e costeiros, esse número aumenta bastante e, no quesito consumo, nesses países cerca de 70% da proteína consumida é proveniente de pescados (FAO, 2013).

A produção pesqueira e de aquicultura no mundo foi de 158 milhões de toneladas em 2012, cerca de 10 milhões de toneladas a mais do que em 2010. O peixe continua a ser um dos alimentos mais comercializados no mundo, tendo atingido o valor de cerca de 13 bilhões de dólares em 2012, com tendência ao crescimento (FAO, 2013).

A porcentagem da produção pesqueira utilizada para consumo humano aumentou de cerca de 70 por cento nos anos 80 para um nível recorde de mais de 85 por cento (136 milhões de toneladas) em 2012. Ao mesmo tempo, o consumo de peixe per capita aumentou de 10 kg na década de 60 para mais de 19 kg em 2012 (FAO, 2013).

2 Produção e consumo de pescado no Brasil

No ano de 2013, o Brasil quase dobrou a produção de pescado - foram 2,5 milhões de toneladas, contra 1,5 milhão de toneladas de 2012, no entanto, a produção está muito abaixo da capacidade do país (BRASIL, 2013). Segundo dados estimados pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), em 2011, a importação de pescado e subprodutos atingiu US\$ 1.2 bilhões, enquanto a exportação do produto nacional atingiu US\$ 271.193.147 (42.263.415 kg) (BRASIL, 2011).

No Brasil, o consumo de pescado ainda é baixo, mesmo tendo aumentado nos últimos anos para 11,17 kg por habitante por ano (BRASIL, 2013), valor ainda abaixo do mínimo recomendado pela Organização Mundial de Saúde, que é de 12 kg por habitante por ano (FAO, 2012), no entanto, 14,5% a mais do que em relação ao ano anterior (BRASIL, 2010).

3 Doenças veiculadas por alimentos (DVAs)

A Organização Mundial da Saúde estima que anualmente ocorrem 1,2 bilhões de episódios de diarreia e cerca de 2,2 milhões de óbitos atribuídos ao consumo de alimentos contaminados (OPAS, 2008). Sabe-se que aproximadamente 43% das zoonoses descritas como de interesse em Saúde Pública, são de origem alimentar o que define a importância do estudo destas enfermidades (OMS, 2009).

No Brasil, conforme dados apresentados pelo Ministério da Saúde, no ano de 2013, ocorreram 800 surtos de DVAs no país, com 2.950 doentes e 6.286 pessoas expostas ao risco. De todos os surtos relatados até hoje, por patógenos de origem alimentar, em 51,34% dos casos, não houve elucidação do agente causador. No entanto, pouco se sabe sobre a magnitude real deste problema no Brasil devido à falta de notificação de muitos casos e surtos de DVAs (SVS, 2014).

Apesar da comprovada relação de várias doenças com a ingestão de alimentos contaminados, do elevado número de internações hospitalares e da persistência de altos índices de mortalidade infantil por diarreia, em alguns estados e municípios do Brasil, pouco se conhece da real magnitude do problema, pois os casos e surtos de DVA não são notificados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Em geral, os veículos para a maioria das doenças transmitidas por alimentos são: a carne bovina (8,53%), as aves (4,14%), os ovos e produtos lácteos (14,62%) e os frutos do mar (6,63%) (RANTSIOU, 2008). Este valor é bastante preocupante se for levado em consideração que os frutos do mar são consumidos em menor quantidade e frequência em relação aos outros alimentos.

4 Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs) através de pescado

Entre os produtos de origem animal, o pescado é um alimento de extrema importância na dieta dos seres humanos, possui um alto valor nutricional, rico em proteínas, vitaminas e sais minerais contribuindo na preservação e manutenção da saúde humana. Porém em

algumas situações podem servir como importante via de transmissão de agentes infecciosos (GAMBARIN et al., 2012).

Em virtude das características de composição, atividade de água, potencial eletrolítico e condições de higiene, transporte e armazenamento, os pescados frescos são vulneráveis à ação de microrganismos deterioradores e patogênicos ao homem. Estes fatores favorecem a colocação dos pescados no topo da lista de alimentos associados com doenças veiculadas por alimentos (ABABOUCHE et al., 2005).

Alguns frutos do mar são inerentemente mais potencialmente perigosos do que outros, devido a muitos fatores, incluindo a natureza do ambiente de onde eles vêm, seu modo de alimentação, a época em que eles são pescados e como eles são preparados e servidos (BASTI et al., 2006).

Todos os frutos do mar podem ser suscetíveis à superfície ou contaminação de tecidos de origem a partir do meio marinho. Moluscos bivalves alimentam por filtração de grandes volumes de água do mar. Durante este processo, em que podem acumular-se e concentrar-se micro-organismos patogênicos que estão naturalmente presentes em águas de colheita, tais como *Vibrio spp.* Surto de doenças associadas ao marisco, ligadas às águas poluídas tem sido causado por calicivírus, vírus da hepatite A, e *Salmonella typhi* entérica (BASTI et al., 2006).

As bactérias patogênicas relacionadas a alimentos marinhos podem ser divididas em três grupos, aquelas que são componentes naturais de ambientes marinho ou estuário (*Vibrio spp.*, *L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum* e *Aeromonas hydrophila*); bactérias entéricas que estão presentes neste ambiente devido a contaminação fecal; e aquelas que contaminam os alimentos durante o processamento (NORHANA et al., 2010).

Embora a cadeia de produção de frutos do mar enfrente várias ameaças, apenas algumas espécies microbianas, incluindo *Listeria spp.*, *Salmonella spp.*, e *Vibrio spp.* têm sido exaustivamente estudados no que diz respeito à sua prevalência e impacto sobre os regulamentos e a saúde pública (GHANBARI et al., 2013).

5 *Listeria*

Listeria é uma bactéria conhecida dos cientistas já há muitos anos. Suas características de patógeno intracelular vêm atraindo estudos desde que Murray, Webb e Swann relataram, em 1924, o primeiro isolamento de um microrganismo que foi responsável por uma

leucocitose mononuclear típica em coelhos denominando-o de *Bacterium monocytogenes*. Pirie, em 1930, isolou um microrganismo semelhante em roedores e o nomeou de *Listerella hepatolytica* em homenagem ao cirurgião britânico, Sir Joseph Lister. A denominação *Listeria monocytogenes* só foi definida em 1940 e, em 1948, foi incluída no Manual Bacteriológico Determinativo de Bergey (CRUZ et al., 2008).

Os membros do gênero *Listeria* são bastonetes gram-positivos que são encontrados como unidades individuais ou em cadeias curtas e não são produtoras de esporos. São móveis a 28°C, por meio de um a cinco flagelos peritríquios, mas são menos móveis a 37°C. A temperatura ótima de crescimento é entre 30°C a 37°C, mas o patógeno é capaz de se multiplicar em temperaturas de refrigeração (4° C) (GARRIDO et al., 2010).

O gênero *Listeria* é composto por 10 espécies: a mais frequentemente encontrada *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria grayi*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, e as mais recentemente reconhecidas: *Listeria marthii* , *Listeria rocourtiae* , *Listeria weihenstephanensis* e *Listeria fleischmannii* (BERTSCH et al., 2013; LANG et al., 2013). No entanto, somente são consideradas patogênicas para humanos as espécies *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* (PAGADALA et al., 2012).

Conforme descrito na **Tabela 01**, a qual compara a virulência de cada espécie de *Listeria* em humanos e animais, foram reportados somente onze casos de infecção por *Listeria ivanovii* em humanos (OIE, 2014).

Tabela 01: Espécies de *Listeria* e capacidade de virulência em humanos e animais.

Espécies de <i>Listeria</i>	Virulência em humanos	Virulência em animal
<i>L. monocytogenes</i>	+	+
<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>Ivanovii</i>	-	+
<i>L. innocua</i>	-	+
<i>L. welshimeri</i>	-	-
<i>L. seeligeri</i>	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>Grayi</i> L.		
<i>ivanovii</i> subsp. <i>murrayi</i>	-	+
<i>L. marthi</i>	-	-
<i>L. rocourtiae</i>	-	-
<i>L. Weihenstephanensis</i>	-	-

Fonte: (OIE, 2014).

Casos de listeriose geralmente resultam do consumo de alimentos contaminado, sendo que as espécies de *Listeria* têm sido isoladas a partir de uma variedade de produtos, incluindo alimentos prontos para o consumo e alimentos contaminados no ambiente de processamento (HAGE et al., 2014).

A presença de *Listeria spp* em alimentos pode ser utilizada como um micro-organismo indicador, pois sua presença demonstra que existiram condições para o crescimento de cepas patogênicas (HAGE et al., 2014).

6 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes representa uma preocupação constante para as indústrias de alimentos e órgãos oficiais de regulamentação, pois além de sua característica ubiqüitária, esta espécie possui habilidade de sobreviver em condições adversas e tem capacidade para crescer em temperaturas de refrigeração, resistir ao congelamento e aos diversos antimicrobianos, tornando um dos microrganismos de grande importância entre os patógenos de veiculação alimentar (GANDHI & CHIKINDAS, 2007).

Apesar de não ser uma líder como causa de DVAs, a *L. monocytogenes* está entre as principais causas de morte por doenças

transmitidas por alimentos. Um relatório recente dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estima que a *L. monocytogenes* provoca 255 mortes nos EUA anualmente (FDA, 2012).

No Canadá, a taxa nacional relatada de listeriose tem aumentado ao longo dos últimos anos. De 2,3 casos por milhão de habitantes em 2000, para 4,2 casos por milhão de habitantes em 2007 (PHAC, 2007; CLARK et al., 2009). Um aumento acentuado na incidência foi notado em 2008, com 7,2 casos por milhão de habitantes (PHAC, 2009a).

Isso ocorreu, em grande parte atribuível a dois grandes surtos envolvendo 57 e 40 casos confirmados, respectivamente (PHAC, 2009b; PHAC, 2010, GAULIN E RAMSAY, 2010). França, Reino Unido e vários outros países europeus também relataram aumento da incidência de listeriose ao longo dos últimos anos. Nesses países, o aumento tem sido predominantemente impulsionado por um aumento da incidência em pacientes > 60 anos de idade (GOULET et al, 2008; ACMSF, 2009).

6.1 Características do agente

L. monocytogenes é uma bactéria gram positiva, resistente; tolerante ao sal e não só pode sobreviver em temperaturas abaixo de 1° C, mas também crescer nestas condições, ao contrário muitos outros agentes patogênicos. Também é notável por sua persistência em ambientes de fabricação de alimentos. A bactéria é onipresente no ambiente e pode ser encontrada em ambientes úmidos, solo e vegetação em decomposição (JEYALETCHUMI et al., 2010a).

L. monocytogenes multiplica-se em pH entre 5,0 e 9,0 com ótimo em pH 7,0 e 7,5. É termolábil, podendo ser destruída durante o cozimento. Temperaturas como as utilizadas para pasteurização de leite a 71,7°C por 15 segundos podem inativar este microrganismo (CRUZ et al., 2008).

A atividade de água ótima para seu desenvolvimento é próxima a 0,97. Contudo, essa bactéria tem a capacidade de multiplicar-se em atividade de água considerada baixa para a multiplicação de patógenos – 0,92. Já foi relatada a sobrevivência de *L. monocytogenes* a 4°C por, pelo menos, 132 dias em caldo triptona de soja contendo NaCl na concentração de 25,5%, com *A_w* de aproximadamente 0,83 (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

L. monocytogenes está distribuída amplamente no ambiente; é encontrada em solos, água, águas residuais e vegetação em decomposição.

É comum no intestino de humanos e animais domésticos, produtos agrícolas frescos e meio ambiente da área de processamento na indústria (MCLAUHLIN et al., 2004; OIE, 2014).

6.2 Listeriose

A listeriose pode se manifestar de duas diferentes formas, ou seja, uma forma invasiva e outra não invasiva. Listeriose invasiva geralmente se desenvolve em pessoas com o sistema imunológico comprometido enquanto a listeriose não-invasiva pode se desenvolver em qualquer pessoa, quando um grande número de bactérias (por exemplo, $>10^3$ UFC / g) são consumidos (EC 2073/2005; FDA, 2012).

Segundo Silva et al. (2007) e Cruz et al. (2008), as manifestações associadas com *L. monocytogenes* incluem desde sintomas semelhantes a um simples resfriado com febre baixa e mal estar, que pode passar despercebido, ou evoluir para meningite, meningoencefalite, septicemia, aborto ou parto prematuro.

Vários modos de transmissão foram identificados: mãe-feto através de infecção no útero ou infecção durante o parto, animal para humano e, o mais importante, a transmissão para os seres humanos através do consumo de alimentos contaminados (MCLAUHLIN et al., 2004).

A infecção de adultos saudáveis é relativamente rara. A maior incidência de listeriose é entre as mulheres grávidas, os idosos (> 60 anos de idade) e indivíduos imunocomprometidos. Entre os idosos, o risco aumenta com a idade, ou seja, em comparação com indivíduos saudáveis de 40 a 59 anos de idade, os dados canadenses mostram que as pessoas de 65 a 69 anos de idade têm o risco 4 vezes aumentado, enquanto aqueles com idade entre 75 a 79 anos de idade têm quase 9 vezes mais risco de contrair a doença (PHAC, 2009).

Mclauchlin et al (2004) também descreve que a maioria dos casos são encontrados em pacientes imunodeprimidos (por exemplo, pessoas com câncer, infecção pelo HIV, diabetes mellitus, problemas cardíacos, indivíduos com cirrose alcoólica e/ou insuficiência renal), em idosos e mulheres grávidas, bem como recém-nascidos. Ainda segundo os autores há casos subclínicos, descritos nos EUA, Itália e na Escandinava.

Os sintomas são geralmente amenos em mulheres grávidas, no entanto, a passagem do micro-organismo através da placenta poderá causar aborto, natimorto, ou septicemia perinatal ou meningite no recém-nascido (HEALTH CANADA, 2010). Mclauchlin et al (2004)

cita, ainda, a ocorrência de trabalho de parto prematuro, infecção precoce do recém-nascido. Resultados demonstram que quando a infecção ocorre no início da gestação, ocorre septicemia e angústia respiratória. Quando a infecção é tardia, 7 a 20 dias após o parto ocorre sinais de meningite neonatal resultando em aproximadamente 10% da mortalidade (ROBERT et al., 2009).

Em comparação a outras bactérias que causam doenças transmitidas por alimentos, a *L. monocytogenes* é uma das mais frequentes causas de morte, ou seja, 20-30 % das infecções de listeriose de origem alimentar em indivíduos de alto risco são fatais (HEALTH CANADA, 2010). Um dos motivos relatados é a capacidade do micro-organismo de infectar órgãos tais como o cérebro, fígado, placenta, além da corrente sanguínea (ROBERT et al., 2009).

Segundo o FDA (2012) a forma grave da infecção por *L. monocytogenes* tem uma letalidade taxa de 15% a 30%, em geral. Quando ocorrem complicações, a taxa de letalidade pode ser muito elevada, como no caso de meningite, chegando até em torno de 70%, 50% no caso de ocorrer septicemia e, em infecções perinatais / neonatais , mais do que 80%.

A gastroenterite causada por *L. monocytogenes* tem um período de incubação relativamente curto, de algumas horas a dois ou três dias. Já a forma grave e invasiva da doença pode ter um período de incubação muito longo, estima-se que pode variar de 3 dias a 3 meses (FDA, 2012).

6.3 Mecanismos de patogenicidade

A *L. monocytogenes* possui 13 sorotipos que podem causar doença, porém mais que 90% dos isolados humanos pertencem aos 3 sorotipos: 1/2a, 1/2b, e 4b (SWAMINATHAN et al., 2007). Cepas pertencentes ao sorotipo 4b são altamente virulentas, podendo ser fatal mesmo em indivíduos saudáveis. A natureza invasiva de *L. monocytogenes* leva a condições fatais, tais como septicemia, meningite e encefalite, entre outras condições (CHIARINI et al., 2009; JADHAV et al., 2012; RODRÍGUEZ et al, 2004a; WARRINER; NAMVAR, 2009).

L. monocytogenes é patógeno intracelular facultativo, sobrevivendo e proliferando em macrófagos, enterócitos e outras células. Penetra no organismo do homem por ingestão e necessita aderir à mucosa intestinal. A bactéria possui motilidade por flagelos, mas só é móvel a temperaturas entre 20°C a 25°C. O microrganismo desenvolveu

estratégia para movimentar-se de outra maneira no corpo humano, sendo este um ponto importante para a sua virulência. *Listeria monocytogenes* requisita actina da célula hospedeira para se mover através e entre as células do hospedeiro, similarmente à *Shigella* spp. (AL-ZEYARA et al., 2011).

A fim de colonizar o trato gastro intestinal, o microrganismo deve sobreviver às condições adversas, como a acidez estomacal, a alta osmolaridade e a presença de sais biliares no intestino delgado (RODRÍGUEZ et al, 2004a). O intestino delgado é o primeiro local onde ocorre a invasão, a partir daí *L. monocytogenes* pode espalhar-se de uma célula para outra sem sair para o ambiente extracelular, escapando assim a partir do sistema imunitário para células T humanas, e invadir outros tecidos e órgãos (WARRINER; NAMVAR, 2009).

É muito importante para este agente patogênico conseguir entrar numa célula a fim de replicar e, assim, provocar a listeriose (MEEKS et al, 2009). Assim, o ciclo de infecção por *L. monocytogenes* inicia-se com a adesão da bactéria à superfície da célula eucariótica e posterior entrada na mesma através de fagocitose ou, no caso de células não-fagocíticas, pela interação entre moléculas ligante presentes na superfície da bactéria e receptores da superfície da célula eucariótica. A invasão ocorre por um mecanismo conhecido como “zíper” no qual a bactéria progressivamente vai penetrando na célula até que seja totalmente internalizada (JADHAV et al., 2012).

Os ligantes de *L. monocytogenes* são principalmente as internalinas A e B (InlA e InlB), que são proteínas de superfície caracterizadas por possuir repetições ricas em leucina (LRR), responsáveis por intermediar a ligação com a célula do hospedeiro. Estas proteínas são codificadas pelos genes *inlA* e *inlB*. (CABANES, 2004).

Em pouco tempo após fazer contato com as células dos tecidos, a bactéria *Listeria* é fagocitada. Uma vez no interior do fagossomo, o microrganismo secreta hemolisinas (sendo a listeriolisina O, seu maior fator de virulência) e fosfolipases. A Listeriolisina O (LLO) é uma proteína tóxica codificada pelo gene *hly* (JACQUET, 2002).

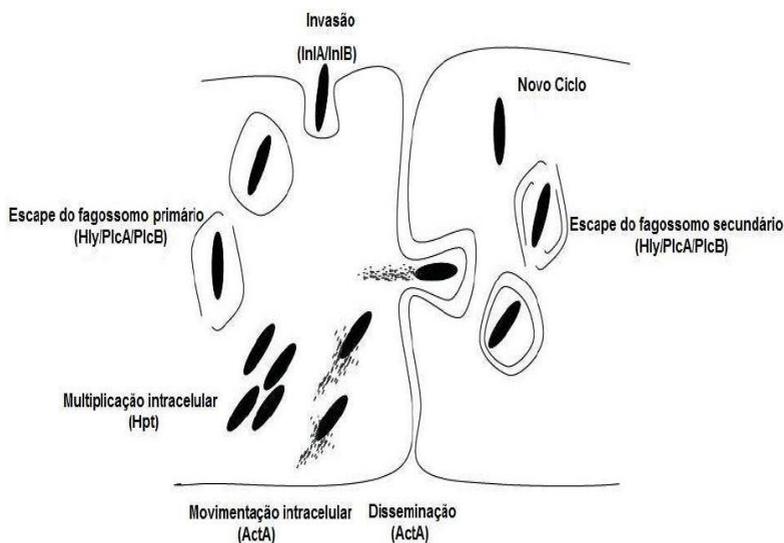
Durante a infecção, a LLO provoca rompimento das membranas, especialmente aquelas formadas entre os vacúolos fagocitários e os lisossomas, além da formação de poros ou lesões na mesma. Esses poros possivelmente facilitam o acesso das fosfolipases e de seus substratos ao interior celular. As fosfolipases irão auxiliar na

degradação final da membrana da própria célula invadida (CHURCHILL et al., 2006; LE MONNIER, 2011).

Isso evita, portanto, a formação dos fagolisossomas, que poderiam destruir a bactéria por meio das hidrolases ácidas aí existentes. *Listeria*, assim, sobrevive e se multiplica dentro das células fagocitárias. As enzimas hidrolíticas, após a ruptura das membranas dos lisossomas, são liberadas e provocam a destruição dos macrófagos e monócitos (CABANES, 2004).

A **figura 01** demonstra o ciclo de vida intracelular da bactéria, incluindo os genes de virulência envolvidos em cada etapa.

Figura 01: Ciclo de vida intracelular da *L. monocytogenes*.



Fonte: TILNEY; PORTNOY, 1989.

A temperatura é muitas vezes utilizada como um sinal para controlar a transcrição de genes de virulência necessários para a infecção ou genes necessários para a persistência no meio ambiente. No entanto, muito pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que permitem as bactérias se adaptarem e responderem a flutuações de temperatura (KAMP; HIGGINS, 2011).

6.3.1 Gene de virulência *hly*

Diversos estudos vêm sendo realizados com os genes envolvidos na virulência de *L. monocytogenes*, e novas descobertas sobre suas funções e mecanismos de ação começam a surgir (LE MONNIER, 2011).

O gene da hemolisina, *hly*, foi o primeiro fator de virulência identificado e sequenciado em *Listeria* sp. A Listeriolisina O (LLO) produzida por ele tem uma ação importante no ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes*. Ela permite que a bactéria escape dos vacúolos, primário e secundário, de defesa da célula invadida e, então, permaneça livre no citosol para sua multiplicação e disseminação. Também possui ação citotóxica em células fagocíticas (JACQUET, 2002; LE MONNIER, 2011).

A ação da toxina LLO, produzida pelo gene *hly*, é considerada a mais importante entre os fatores de virulência em *L. monocytogenes*. Em função disso, este gene vem sendo amplamente estudado e já tem sido utilizado inclusive para a detecção específica de *L. monocytogenes* em produtos alimentícios (LE MONNIER, 2011).

6.4 Dose infectante

A dose infectante de *L. monocytogenes* é indeterminada, mas acredita-se variar de acordo com a cepa, a susceptibilidade do hospedeiro, além de se acreditar que a matriz alimentar envolvida também possa afetar a relação dose –resposta (FDA, 2012).

No entanto, Bortolussi (2008) define que a dose infectante desse patógeno alimentar é estimada entre 10-100 milhões de unidades formadoras de colônias (UFC) em hospedeiros saudáveis, e somente 0,1-10 milhões de UFC em pessoas com condições predisponentes. Já Warriner e Namvar, (2009) definem que, embora não totalmente esclarecida, a dose necessária para causar doença em indivíduos susceptíveis podem ser na ordem de 100 a 1000 células do patógeno.

Um modelo de dose- resposta definitiva para *L. monocytogenes* em seres humanos ainda não foi estabelecido. No entanto, com base em dados de casos atuais de todo o mundo, a probabilidade de qualquer um alimento contaminado com baixo número de *L. monocytogenes*, resultando em doença é considerada como sendo remoto (FAO/WHO, 2004a).

6.5 Alimentos envolvidos

A ocorrência ubíqua e o aumento da capacidade de crescer ou sobreviver em um ambiente refrigerado faz da *L. monocytogenes* um desafio significativo na produção de alimentos em comparação com a maioria dos outros micro-organismos (RANTSIOU, 2008).

L. monocytogenes tem sido isolada de diferentes alimentos, tais como leite cru e pasteurizado, queijo, carne bovina, suína, de aves, peixes, embutidos, carne moída de diferentes animais, produtos cárneos crus e termoprocessados, além de produtos de origem vegetal, de origem marinha, e refeições preparadas. Estes isolamentos têm sido realizados em vários países, incluindo o Brasil (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Este é especialmente o caso de alimentos prontos para o consumo, pois estes produtos não recebem nenhum tratamento térmico que possa eliminar uma possível contaminação pela bactéria. Além disso, a *L. monocytogenes* é muito importante nos alimentos já processados termicamente, os quais podem ser contaminados no ambiente de produção, durante a sua fabricação (FDA, 2012, EC 2073/2005, RANTSIOU, 2008).

Clark et al., (2010) descreve que surtos de listeriose têm sido atribuídos a produtos alimentares RTE (*READY TO EAT*- pronto para o consumo), como patês, salsichas, certos tipos de charcutaria, *wraps* de frango, queijo feito de leite cru ou leite pasteurizado, leite pasteurizado (incluindo leite com chocolate), manteiga, bolos congelados, sorvetes, creme de leite, salada de repolho, salada de frutas, pescados, mexilhões fumados, truta defumada, carne de caranguejo, camarão, sanduíches pré-embalados, assim como arroz e salada de milho.

No entanto, os alimentos implicados em grandes surtos de listeriose em todo o mundo são normalmente aqueles em que a bactéria está presente ou pode crescer a níveis que podem apresentar um risco para os consumidores. Em geral, o risco de contrair listeriose de origem alimentar depende de fatores como a susceptibilidade do hospedeiro, a quantidade e frequência de consumo do alimento contaminado, a frequência, distribuição e nível de *L. monocytogenes* no alimento (FAO / WHO, 2004b).

Os alimentos que contêm baixos níveis de *L. monocytogenes* (por exemplo, <100UFC/g) representam baixo risco (CHEN et al., 2003; FAO/WHO, 2004b). De fato, em casos onde alimentos ligados a surtos de listeriose ainda estavam disponíveis para testes, os níveis de *L. monocytogenes* detectado têm sido geralmente elevados (ou seja, > 103 UFC / g), o que são consideradas amostras não conformes (EC

1441/2007). Conseqüentemente, são considerados de risco baixo os alimentos em que o organismo não pode crescer ou possui um potencial limitado para o crescimento em que os níveis não excedam 100 UFC / g até o prazo de validade indicado (EC 1441/2007).

A contaminação de produtos prontos para o consumo com *L. monocytogenes* pode ocorrer em vários estágios, por meio de manipuladores de alimentos, no local de processamento, durante a adição de ingredientes crus, ou após tratamento de letalidade na área de embalagem de alimentos (LIANOU; SOFOS, 2007).

A manutenção da cadeia de frio é um meio efetivo para prevenir a multiplicação de microrganismos em produtos alimentícios. Porém a habilidade de alguns psicotrópicos como a *L. monocytogenes* em multiplicar-se a temperaturas de refrigeração é um motivo de preocupação. A temperatura de estocagem a 2°C e a redução de oxigênio em embalagens a vácuo permite a multiplicação de *L. monocytogenes* em níveis detectáveis, por sua característica de anaerobiose facultativa. *L. monocytogenes* também sobrevive a mudanças drásticas como as que ocorrem no abate e nas operações de refrigeração (CATTANI, 2011).

A presença de *L. monocytogenes* em produtos cozidos indica em sua maioria, contaminação pós-processamento térmico (ICMSF, 2005). A contaminação por *L. monocytogenes* em produtos processados também pode ser decorrente de contaminações cruzadas de mãos e luvas de manipuladores (BARBALHO et al., 2005), e do ambiente mal higienizado. As falhas na higienização (limpeza e sanitização) de equipamentos e utensílios, associados à contaminação ambiental no interior das instalações frigoríficas é fator de contaminação de cepas persistentes (GIBBONS et.al., 2006; KARAKOLEV, 2009).

6.6 Legislação e Parâmetros para *Listeria monocytogenes* no mundo

Não há consenso sobre os “níveis aceitáveis” de *L. monocytogenes* nos alimentos no mundo. Como mostrado na **Tabela 02**, os critérios diferem significativamente entre as regiões e as autoridades alimentares (GHANBARI et al., 2013).

Tabela 02: Critérios microbiológicos para *L. monocytogenes* em produtos alimentares RTE, incluindo frutos do mar.

PAIS	CATEGORIA DE ALIMENTO	LIMITE MICROBIOLÓGICO	REFERÊNCIA
Austrália e Nova Zelândia	RTE - Grupo 1: alimentos que suportam o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> e são mantidos estocados por mais de 1 dia	Ausência em 25 g (n=5, c=0)	FSANZ (2001)
	RTE - Grupo 2: alimentos que não suportam o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> e são mantidos estocados por mais de 1 dia	Ausência em 25 g se presente em <100UFC (n=5, c=0)	
	RTE - Grupo 3: alimentos que são consumidos imediatamente e que não são estocados por mais de um dia	Ausência em 25 g se presente em <100UFC (n=5, c=0)	
Canadá	Categoria 1: (Alta prioridade) RTE - produtos de pescado (o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> pode ocorrer, mas não exceder 100 UFC/g antes do fim da vida de prateleira estabelecida) por exemplo, patês de pescado refrigerados ou mousses.	Ausência em 25 g (n=5)	
	Categoria 2A: (Média a baixa prioridade) RTE - produtos de pescado (o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> pode ocorrer, mas não exceder níveis maiores que 100 UFC/g antes do fim da vida de prateleira estabelecida) por exemplo, salmão defumado e sushi.	<100UFC/g in 10g (n=5)	
	Categoria 2B: (Baixa prioridade) RTE - produtos de pescado (o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> não pode ocorrer durante a vida de prateleira estabelecida) por exemplo, camarão congelado;	<100UFC/g in 10g (n=5)	
	Para alimentos sob refrigeração (excluindo alimentos congelados) ou dietas especiais para crianças.	Ausência em 25 g	Arfénino (2007)
China	Para outros produtos RTE	<20UFC/g	
EU	Produtos RTE para crianças e propósitos médicos	Ausência em 25 g (n=10, c=0)	(EC 2005) alterada por (EC) N° 1441/2007
	Produtos RTE capazes de suportar o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> e outros produtos RTE para crianças e propósitos médicos	100 UFC/g (n=5, c=0)	
	Produtos RTE incapazes de suportar o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , e outros produtos RTE para crianças e propósitos médicos	100 UFC/g (n=5, c=0)	
EUA	Produtos marinhos RTE	Ausência em 25 g	FDA (2011).

Fonte: Jami et al., (2014)

O Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos (RDC Nº 12, Agência Nacional de Vigilância Sanitária) no Brasil não define o limite de tolerância para *L. monocytogenes* em produtos de pescado. No entanto, entende-se, pela importância do patógeno para a saúde pública, que a tolerância para a presença desse micro-organismo seja zero. O Ministério da Agricultura utiliza como parâmetro para as análises oficiais, ausência de *L. monocytogenes* em 25 g ou ml de produto

6.7 Incidência de *Listeria monocytogenes* no Brasil e no mundo

Os esforços excessivos para controlar *L. monocytogenes* podem reduzir o nível de contaminação, mas não se pode, com as tecnologias atuais, erradicar *L. monocytogenes* da área de processamento na indústria e nem eliminar completamente o potencial de contaminação dos produtos prontos (BENETTI et al., 2012).

Surtos de *L. monocytogenes* em produtos prontos para o consumo, têm sido relatados no mundo todo, devido à sua habilidade de sobreviver e multiplicar no vácuo e em produtos embalados em atmosfera modificada e temperatura de refrigeração (MIYASAKI et al., 2009).

A incidência de *L. monocytogenes* em alimentos RTE varia de 0 a 10% (LITTLE et al., 2009). Um grande estudo nos EUA descobriu que a prevalência de *L. monocytogenes* em produtos RTE, como frutos do mar, carnes defumadas, saladas e queijos variou 0,17-4,7 % (GOMBAS et al., 2003).

Além disso, um estudo recente na Europa constatou que a prevalência de *L. monocytogenes* em produtos da RTE, como carnes em fatias, queijos, sanduíches, manteiga, produtos de confeitaria contendo sorvete e bebidas probióticas variou de 0 a 7,0 % (LITTLE et al., 2009).

Cattani (2011) analisou 649 produtos cárneos de suínos para *L. monocytogenes*, encontrando o patógeno em 9,40% das amostras, sendo que as amostras positivas incluíam carne suína *in natura*, ingredientes para feijoada e churrasco, linguiça frescal, carne suína temperada, coração recheado, sobrepaleta recheada, espetinho, salsichas, linguiças cozidas e defumadas, mortadela, pratos prontos para o consumo, presunto fatiado, apresuntado e lanche.

Em agosto de 2008 foram colhidas 27 amostras de carne moída crua em açougues de Araguaína do estado de Tocantins, das quais 5 (18,5%) foram positivas (MONTEIRO, 2009). Já em Niterói

(RJ), foi encontrado *Listeria* spp. em 80% das amostras de *blanquet* de peru fatiado e em 90% das amostras de presunto de peru fatiado. Destas, 52 cepas eram *L. monocytogenes*, sendo 51,9%, 34,6%, 7,7%, 5,8%, pertencentes as sorotipos 4b, 1/2c, 1/2b e 1/2a, respectivamente (ARAÚJO, 1998).

Numa pesquisa realizada em Niteroi (RJ) das 40 amostras de carne de frango congeladas, isolaram-se 246 cepas de *Listeria* spp., sendo 52 cepas de *L. monocytogenes*, três de *L. ivanovii*, 24 de *L. seeligeri*, 35 de *L. innocua* e 132 de *L. welshimeri*. Das cepas de *L. monocytogenes*, 51,9% pertenciam ao sorotipo 1/2 b, 30,8% ao 4 b e 17,3% ao 1/2 c (GONÇALVES, 1998).

6.8 Incidência de *Listeria monocytogenes* em produtos de pescado

Listeria spp. é componente da microflora nativa da água, portanto, estes micro-organismos estão provavelmente presentes na superfície externa de peixes que nadam nessas águas. *L. monocytogenes* foi detectada na superfície de peixes e no revestimento do estômago, brânquias, e intestinos destes, mas a carne é geralmente livre do micro-organismo, a menos que tenha sido contaminado a partir de diferentes fontes (GUDMUNSDOTTIR et al., 2006; SOUZA et al., 2008).

Em geral, são possíveis duas vias para a contaminação dos peixes por *Listeria*: (1) a propagação de *Listeria* a partir do conteúdo intestinal para outros tecidos dos peixes (incluindo músculos), especialmente se o período entre a morte e a remoção das vísceras é superior a algumas horas; (2) a contaminação cruzada (devido à manipulação de peixes utilizando equipamentos contaminados e ao transporte inadequado (GUDMUNSDOTTIR et al., 2006; SOUZA et al., 2008).

Vários surtos de listeriose têm ocorrido ao longo da última duas décadas, e apesar da *L. monocytogenes* ter sido observada numa grande variedade de alimentos, a maior ameaça deste patógeno é associado com produtos refrigerados que têm uma vida útil longa e produtos que são geralmente consumidos com pouco ou nenhum aquecimento anterior (BREMER et al., 2003).

Considerando a significativa implicação da listeriose para a saúde pública e da importância dos produtos do mar como um veículo para transmissão de *L. monocytogenes*, é importante conhecer a incidência deste patógeno, conforme descrito na **Tabela 03**, que apresenta alguns importantes surtos de listeriose relacionados ao consumo de produtos marinhos (JAMI et al., 2014).

Tabela 03: Produtos do mar implicados em surtos de listeriose humana

PRODUTOS	PAÍS	ANO	Nº DE CASOS	REFERÊNCIAS
Costeleta de arenque marinado em azeite	Alemanha	2010	8 casos, 1 morte	Aichinger (2010)
Peixe embalado a vácuo (suspeito)	Finlândia	1999 a 2000	10 casos, 4 mortes	Hatakka et al.(2000)
Truta defumada	Finlândia	1999	5 casos	Miettinen et al.(1999)
Salada de atum	Itália	1997	1566 casos	Aureli et al. (2000)
Imitação de carne de caranguejo	Canadá	1996	2 casos	Farber et al. (2000)
Truta defumada refrigerada (suspeito)	Suécia	1994 para 1995	9 casos, 2 mortes	Ericsson et al. (1997)
Mexilhões defumados	Nova Zelândia	1992	3 casos, 1 morte	Brett et al. (1998); Mc Lauchlin et al. (2004)
Mexilhões defumados	Austrália (Tasmania)	1991	4 casos	Misrachi et al. (1991) Mitchel (1991)
Camarão	EUA	1989	2 casos	Riedo et al. (1994)
Ova de bacalhau defumada	Dinamarca	1989	1 caso	Rocourt (1991)
Peixe	Itália	1989	1 caso	Facinelli et al. (1989)
Peixe ou moluscos	Nova Zelândia	1980	22 casos, 7 mortes	Lennon et al. (1984); Mc

Fonte: Jami et al (2014)

L. monocytogenes foi isolada a partir de 3,3% de amostras de frutos do mar prontos para o consumo no Japão e 54% de pescados frescos comprados nos mercados de varejo nos EUA (DRAUGHON et al., 1999; INOUE et al., 2000; NEETTO et al., 2008).

Destro et al. (1994) relatou a ocorrência de *L. monocytogenes* em camarões processados em indústrias brasileiras. De 178 amostras analisadas, 89 (50,0%) foram positivas para *Listeria sp.*, sendo que, *L. monocytogenes* foi detectada em 32 amostras (18,0%); *L. innocua* em 30 amostras (16,9%); *L. seeligeri* em 40 (22,4%); *L. ivanovii* em 11(6,2%); e *L. welshimeri* em 3% das amostras (1,7%).

Gonzales et al. (2013) relatou que foram analisadas 250 amostras de produtos de pescado, durante um ano, utilizando as metodologias padrão - ISO 11290-1/ A1 e ISO 11290-2. Uma baixa prevalência de *L. monocytogenes* foi observada nos produtos de surimi, enquanto que 4,8% das amostras de salmão defumado foram positivas para *Listeria* com níveis baixos (< 10 UFC/g) e distribuição desigual do patógeno. Uma única empresa foi responsável por 80% dos lotes positivos.

Kovačević et al, em 2012, utilizou métodos convencionais para recuperar *Listeria spp.* a partir de carne (n=40) e peixe (n=40) de amostras coletadas de 17 lojas. *Listeria spp.* foi detectada apenas a partir das amostras de peixes (20%), sendo 5% de *Listeria innocua*, 5% de *L. monocytogenes* e 10% *Listeria welshimeri*. Os isolados de *L. monocytogenes* foram sorotipificados como 1/2-A e 1/2b.

Em um trabalho publicado recentemente por Uyttendaele (2009), foi demonstrado que peixe defumado pode ser considerado um produto de alto risco de contaminação por *L. monocytogenes*, com ocorrência deste patógeno em 28,8% das amostras analisadas e com populações acima de 100 UFC/ml. Também um estudo realizado na cidade de Ribeirão Preto demonstrou a presença de *Listeria spp.* e de *L. monocytogenes* em surubim defumado a frio e embalado a vácuo (ALVES, 2005).

7 Métodos de detecção de *Listeria monocytogenes* em alimentos

Atualmente, os métodos analíticos para análise de *L. monocytogenes* em alimentos, demandam tempo e trabalho para chegar ao diagnóstico final da análise, devido aos vários passos de transferência de inóculos e incubação, necessários para a execução dos métodos. Segundo Gasanov et al. (2005), a identificação de *Listeria spp.* e *L. monocytogenes* usando métodos moleculares está se tornando cada vez

mais popular porque estas técnicas são extremamente precisas, sensíveis e específicas.

Gasanov et al. (2005) afirmam que há uma pressão contínua para o desenvolvimento de análises mais rápidas e métodos sensíveis, o que resulta da exigência das autoridades, as quais buscam proteger o consumidor, ao passo que a indústria alimentar está sob pressão para liberar os alimentos para o mercado antes do prazo de validade.

7.1 Métodos convencionais para detecção *Listeria monocytogenes*

Existe uma variedade de métodos convencionais atualmente disponíveis para a detecção e identificação de *L. monocytogenes* em amostras de alimentos. Os métodos bacteriológicos convencionais são importantes por várias razões: seu uso resulta em uma cultura pura do organismo, o que é útil para fins de fiscalização e gestão de surtos epidemiológicos (ANDREWS, 2002).

Tais métodos continuam a ser os “padrões de ouro” contra os quais outros métodos são comparados e validados. Estes métodos são geralmente sensíveis e não requerem equipamentos sofisticados e dispendiosos, facilitando o seu uso (ANDREWS, 2002).

Algumas das desvantagens desse grupo de métodos incluem o longo período de tempo que requerem os protocolos para uma conclusão definitiva, as várias manipulações, a exigência de uso de muitos produtos químicos, reagentes e meios diferentes, a possibilidade de contaminação de micro-organismos que mascaram a presença dos patógenos alvos, incluindo crescimento excessivo, variantes atípicas do organismo alvo e relativa subjetividade envolvida ao interpretar o crescimento bacteriano em placas de ágar seletivos e diferenciais (ANDREWS, 2002).

7.1.1 ISO 11290-1

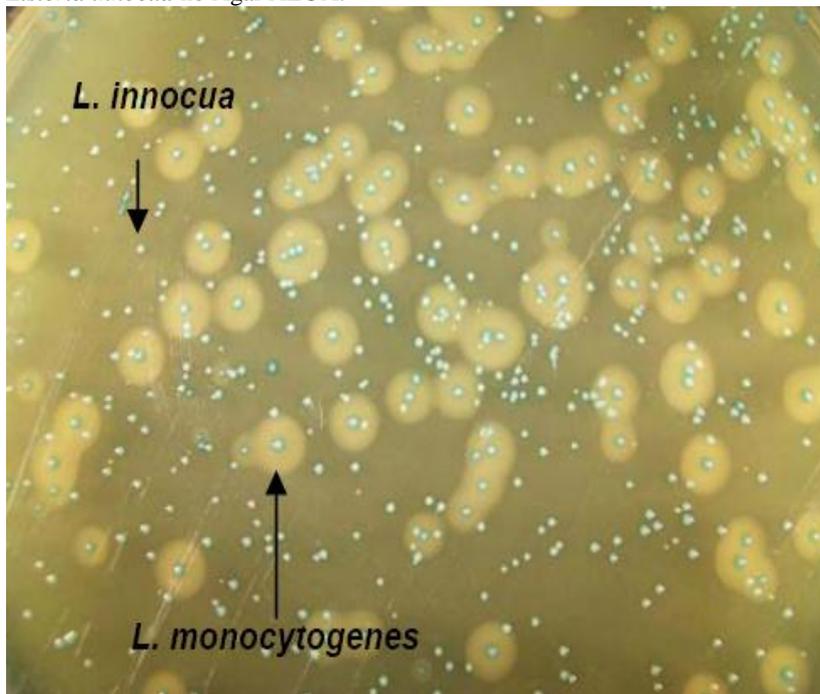
A metodologia ISO11290-1 é o método padrão europeu para a detecção de *L. monocytogenes* em amostras de alimentos e meio ambiente. O método baseia-se em um enriquecimento de dois passos. No primeiro passo, que dura vinte e quatro horas, é utilizado o Caldo Half-Frasier para recuperação das células injuriadas. Já a segunda etapa, de quarenta e oito horas, é realizada utilizando o Caldo Frasier para multiplicação seletiva de *L. monocytogenes* (DALMASSO et al., 2014).

Listeria spp pode estar presente em pequeno número e acompanhada por considerável número de micro-organismos de outros

gêneros. Em função disso, as duas primeiras etapas são realizadas afim de selecionar o gênero *Listeria* em detrimento da microbiota acompanhante bem como promover a recuperação de células injuriadas de *Listeria* spp (ISO11290-1, 1996).

Ambas as culturas em Caldo Frasier e Caldo Half-Frasier são plaqueadas em ágar, a fim de detectar colônias suspeitas *L. monocytogenes*, as quais necessitam ser posteriormente confirmadas (DALMASSO et al., 2014). O isolamento em meios sólidos seletivos diferenciais, em especial o Ágar ALOA (Ágar *Listeria* Ottaviani e Agosti) permite a diferenciação de *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* das demais espécies de *Listeria* (ISO11290-1, 1996) conforme demonstra a **Figura 02**.

Figura 02: Diferenças morfológicas das colônias de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* no Ágar ALOA.



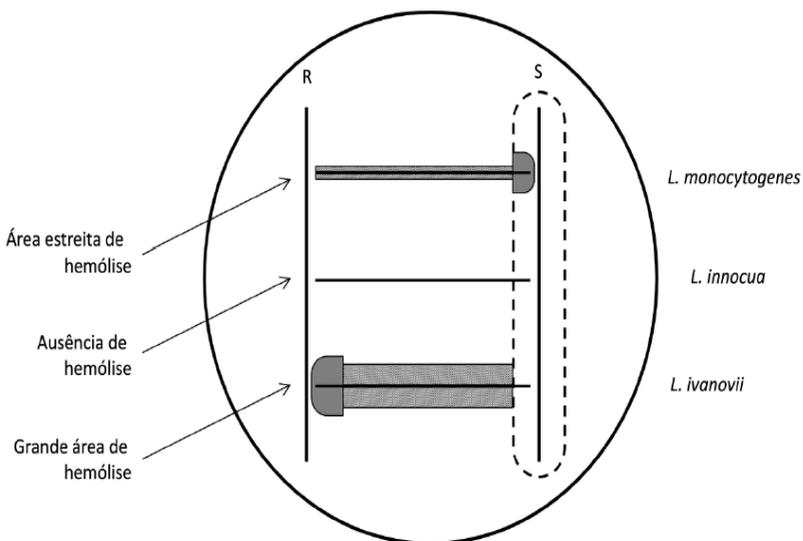
Fonte: Biolife (2005).

Já no ágar LSA (Ágar Oxford ou Ágar base seletivo *Listeria*) as colônias de *L. monocytogenes* apresentam-se inicialmente pequenas, acinzentadas e com halos enegrecidos. Após 48h a colônia torna-se mais

escura podendo apresentar um brilho esverdeado, possuindo cerca de 2mm de diâmetro e halos enegrecidos, com centro côncavo (ISO11290-1, 1996).

A confirmação final das colônias típicas é realizado por testes bioquímicos, que podem levar alguns dias. A *L. monocytogenes* caracteriza-se por produzir compostos ácidos a partir de Ramnose, possuir atividade β -hemolítica em ágar sangue e motilidade guarda-chuva. Já no teste CAMP (demonstrado na **Figura 03**), as cepas de *L. monocytogenes* produzem uma reação hemolítica discreta, apresentando um halo de hemólise mais nítido nas proximidades das estrias de *S. aureus*. Estas características bioquímicas são importantes para a diferenciação entre a *L. monocytogenes* e as demais espécies (ISO11290-1, 1996).

Figura 03: Inoculação e interpretação de placas de CAMP teste



Legenda: As linhas verticais representam culturas de *S. aureus* (S) e *R. equi* (R) semeadas. As linhas horizontais representam a semeadura das culturas teste.

Fonte: ISO 11290-1 (1996).

Assim, este método é demorado e os resultados não podem ser obtidos em menos de sete dias. No caso de um surto de *L. monocytogenes*, o atraso na obtenção dos resultados retarda o processo de detecção da presença de *L. monocytogenes* e a implementação de

ações corretivas para manter a segurança dos produtos alimentares e para proteger a saúde do consumidor (DALMASSO et al., 2014).

7.2 Métodos moleculares para detecção de *Listeria monocytogenes* em produtos de pescado

Os métodos convencionais para a recuperação de *L. monocytogenes* costumam levar de cinco a sete dias para obter um resultado positivo definitivo. A morosidade destes processos levou ao desenvolvimento de vários métodos mais rápidos para detecção de *L. monocytogenes* em produtos alimentares (PAGADALA et al., 2011).

O desenvolvimento de métodos de detecção rápidos, sensíveis e confiáveis para detecção e quantificação de *L. monocytogenes* é muito importante para a indústria de alimentos, principalmente para produtos com vida útil limitada (PAGADALA et al., 2011). A aplicação de métodos moleculares para a detecção de patógenos na área de alimentos dá suporte aos resultados obtidos pelos métodos microbiológicos tradicionais, aumentando a consistência dos resultados (ROSSMANITH; WAGNER, 2011).

7.2.1 PCR

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction), é uma metodologia que pode ser executada inteiramente *in vitro* sem o uso de células. A técnica da PCR foi desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis, que recebeu, em 1994, o prêmio Nobel (LOEFFELHOLZ; DENG, 2006).

A PCR possibilita a síntese de fragmentos de DNA usando a enzima DNA-polimerase, a mesma que participa da replicação do material genético nas células. Esta enzima sintetiza uma sequência complementar de DNA, desde que um pequeno fragmento (o iniciador, ou *primer*, em inglês) já esteja ligado a uma das cadeias do DNA no ponto escolhido para o início da síntese. Os iniciadores definem a sequência a ser replicada e o resultado obtido é a amplificação de uma determinada sequência DNA com bilhões de cópias (CHURCHILL et al., 2006).

Em contraste com outros métodos moleculares, em que relativamente grandes quantidades de alvo DNA ou RNA são necessárias para realizar o teste, o PCR amplifica grandes quantidades de DNA a partir de quantidades diminutas do DNA alvo (GASANOV et al., 2005; BOTTERO; DALMASSO, 2011). O método de reação em

cadeia da polimerase é capaz de fornecer resultados rápidos e sensíveis para a detecção de patógenos em alimentos (PAGADALA et al., 2011).

Assim, o PCR já está estabelecido como uma técnica confiável e reprodutível para a identificação de *Listeria spp.* e, mais importante, para a diferenciação de *L. monocytogenes* (GASANOV et al., 2005; BOTTERO; DALMASSO, 2011).

7.2.1.1 Extração de DNA

A primeira etapa na identificação de micro-organismos baseado em DNA é o isolamento de seu DNA genômico. O isolamento de DNA a partir de matrizes alimentares para utilização em PCR é dificultada pelo fato de muitos ingredientes em alimentos poderem atuar como inibidores de PCR. A qualidade do DNA também pode ser reduzida por muitas das condições comuns a processamentos de alimentos, tais como o baixo pH, altas temperaturas, alta pressão, e hidrólise (CHAPELA et al., 2007; KESMEN et al., 2009; BOTTERO; DALMASSO, 2011).

Existem inúmeros métodos de extração de DNA, manuais e automatizados, com uso de kits comerciais. Independente do método utilizado, os passos básicos para extração do DNA uma amostra consiste em lise celular, ligação, lavagem e eluição final (CHAPELA et al., 2007).

Alguns equipamentos, como o QIAcube® (Qiagen) foram desenvolvidos para realizar a extração automatizada de DNA, sendo que a maior parte dos kits comerciais são desenvolvidos para serem utilizados nesses equipamentos. Cada equipamento possui uma metodologia específica de extração (BOTTERO; DALMASSO, 2011).

O equipamento QIAcube®, por exemplo, utiliza o método de colunas de sílica e segue os mesmos passos da extração manual de DNA (ou seja, lise, ligação, lavagem e eluição). As amostras são lisadas num agitador orbital. Cada amostra lisada é transferida para uma coluna de centrifugação num rotor adaptador. Se precisar ser homogeneizado, o conteúdo lisado é primeiro transferido para a posição central do adaptador de rotor. Os ácidos nucleicos ou proteínas ligam-se à membrana de sílica de purificação da coluna de spin e são lavadas para remover contaminantes. A coluna de centrifugação é transferida para um tubo de microcentrífuga para a eluição dos ácidos nucleicos purificados ou proteínas (Manual do Usuário QIAcube®, 2008).

Atualmente, existem Kits comerciais de extração de DNA de amostras de alimentos, com passos que garantem a eliminação dos

agentes inibidores presentes na matriz alimentar, possibilitando a extração de um DNA puro e em quantidade suficiente para realização da análise posterior, através do PCR (KESMEN et al., 2009).

Esses kits comerciais de extração de DNA aumentam a sensibilidade dos testes moleculares, por possibilitarem a extração de DNA do micro-organismo, mesmo quando este está presente em pequena quantidade na amostra. A utilização da etapa de pré-enriquecimento, recomendada nos protocolos destes Kits possibilita o aumento da sensibilidade do teste (BOTTERO; DALMASSO, 2011).

Os produtos processados têm sido especialmente desafiadores na identificação de patógenos, já que o comprimento máximo de fragmentos de DNA recuperável de cerca é de 250 e 350 pares de bases. Assim, os métodos de isolamento com altos níveis de recuperação de DNA e pureza são essenciais para o sucesso da amplificação de PCR e identificação das espécies de pescado (CHAPELA et al., 2007).

7.2.1.2 PCR em tempo real

A possibilidade de monitorar a PCR em tempo real revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. A PCR em tempo real realiza a detecção e quantificação destes ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (Ct) (LOEFFELHOLZ; DENG, 2006).

O PCR em tempo real geralmente é mais sensível e específico do que as técnicas de PCR convencionais e pode ser facilmente aplicado na rotina com várias análises por possuir requisitos mínimos de preparação laboratorial, por dispensar etapas de processamento pós-PCR, pela reduzida possibilidade de contaminação cruzada e pela geração de resultados por computador. Além disso, a rápida tecnologia PCR é agora comercialmente disponível para ensaios em tempo real e tem sido utilizado na identificação de agentes patogênicos (LIN et al., 2005; HELLBERG; MORRISSEY, 2011).

O PCR em tempo real, usando sondas fluorescentes específicas de sequência (como a sonda TaqMan®) ou corantes fluorescentes não específicos (como o SYBR® Green) permitem a detecção e quantificação de fragmentos de DNA alvo, eliminando a necessidade de eletroforese pós-PCR, reduzindo assim o tempo necessário para obter o resultado (KESMEN et al., 2009; CHUANG et al., 2012).

A detecção de patógenos utilizando PCR em tempo real baseia-se na amplificação de uma região específica do genoma. Após o produto amplificado, o DNA é detectado utilizando sondas fluorescentes, e a medida que o produto de PCR acumula há um sinal de aumento na fluorescência das sondas ligadas, detectando o produto em tempo real. Os resultados são apresentados através de curvas facilmente interpretáveis (Manual do Usuário Rotor-Gene Q®, 2009).

A emissão desses compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado (KESMEN et al., 2009; CHUANG et al., 2012).

O SYBR® Green se liga entre a fita dupla de DNA e com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite uma fluorescência verde. As vantagens da utilização do SYBR® Green são: baixo custo, facilidade no uso e sensibilidade. A desvantagem é a ligação em todo DNA fita dupla que surge durante a reação, incluindo os dímeros dos iniciadores e outros produtos inespecíficos, podendo superestimar a concentração do fragmento alvo. O SYBR® Green não ligado ao DNA exibe uma fluorescência muito pequena. Entretanto, a fluorescência é realçada quando ligado na fita dupla do DNA (BOTTERO; DALMASSO, 2011; CHUANG et al., 2012).

No começo da amplificação, a mistura da reação contém o DNA desnaturado, os iniciadores e o SYBR® Green. As moléculas não ligadas do SYBR® Green apresentam fluorescência fraca produzindo um sinal mínimo sendo este subtraído durante a análise de computador. Após o reconhecimento dos iniciadores, algumas moléculas do SYBR® Green podem ligar-se na fita dupla previamente formada. Durante a polimerização catalisada pela enzima Taq DNA polimerase, as moléculas do SYBR® Green vão se ligando ao DNA recentemente sintetizado (CHUANG et al., 2012; LÓPEZ-ANDREO et al., 2012).

Já a TaqMan® é uma sonda (fragmento de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA) utilizada para detectar seqüências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease 5'→3' da Taq DNA polimerase (HOLLAND et al., 1991; KESMEN et al., 2009).

Durante a PCR em tempo real a sonda TaqMan® hibridiza com a sequência da fita simples de DNA complementar alvo para a amplificação. No processo da amplificação a sonda TaqMan® é degradada devido à atividade exonuclease 5'→3' da Taq DNA polimerase, separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão (GALIMBERTI et al., 2013).

A separação do fluoróforo do *quencher* resulta em um aumento da intensidade da fluorescência. Assim, durante o processo de amplificação a emissão de luz é aumentada de forma exponencial. Esse aumento da fluorescência ocorre apenas quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da sequência alvo é estabelecida (GALIMBERTI et al., 2013). A reação com a TaqMan® é considerada um método sensível para determinar a presença ou ausência de sequências específicas (HOLLAND et al., 1991; KESMEN et al., 2009).

Assim, o PCR em tempo real (qPCR), tem sido introduzido como uma técnica de alto rendimento na análise de alimentos, apresentando resultados em até um dia. Além disso, permite a quantificação e não requer manipulação pós-PCR, reduzindo assim o risco de contaminação cruzada (RUSSO et al., 2014; USHA et al., 2010).

Diversos autores tem utilizado o qPCR para detecção e quantificação de DNA de *L. monocytogenes* em diversas matrizes alimentares, como Rantsiou et al (2008), que desenvolveu uma técnica de qPCR para *L. monocytogenes* utilizando curvas de calibração, através de diluição seriada em amostras para diferentes matrizes alimentares pré enriquecidas.

Russo et al (2014) realizou uma comparação entre a metodologia de NMP (Número mais Provável) com qPCR em vegetais frescos, demonstrando que o qPCR foi capaz de detectar um limite de 10^1 UFC/g de *L. monocytogenes* nas amostras de vegetais testados após 2 horas de pré-enriquecimento. Pagadala et al. (2012) realizou um estudo de prevalência e caracterização de *L. monocytogenes* em caranguejos, através do uso de um protocolo de qPCR.

Jeyaletchumi et al. (2010b) desenvolveu uma pesquisa utilizando o método combinado de PCR-NMP com o objetivo de realizar a enumeração de *L. monocytogenes* em vegetais e comparar os resultados com outros métodos de enumeração de patógenos, obtendo resultados satisfatórios.

Postollec et al. (2011) relatou diversos estudos de detecção de *L. monocytogenes* com base em amostras enriquecidas de alimentos e PCR quantitativo. Ainda outros estudos recentes foram realizados por

Oliveira et al. (2010), Barbau-Piednoir et al. (2012), Dalmasso et al. (2014) Delibato et al. (2014), O'grady et al. (2008), Oravcová et al. (2007), Rodríguez- Lázaro et al. (2004b), Rodríguez- Lázaro et al. (2013), Schoder et al. (2012), Stevens e Jaykus (2004) para detecção de *L. monocytogenes* por PCR em tempo real em amostras de alimentos.

9 REFERÊNCIAS

ABABOUCHE L.; GANDINI G.; RYDER J.; 2005. Causes of detentions and rejections in international fish trade. FAO Fisheries Technical Paper 473. Rome: Food Agriculture Organisation United Nations.

ACMSF (Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food). (2009). Report on the increased incidence of listeriosis in the UK. Ad Hoc Group on Vulnerable Groups. Available at: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/committee/acmsflisteria.pdf> (Accessed on March 28, 2011).

AICHINGER E. *Listeria* infections in Baden-Württemberg and Bavaria, October-November 2010. Epidemiologisches Bulletin Nr. 47, Robert Koch-Institut (Article in German). 2010.

AL-ZEYARA, S. A.; JARVIS, B.; MACKEY, B. M. (2011). The inhibitory effect of natural microflora of food on growth of *Listeria monocytogenes* in enrichment broths. International Journal of Food Microbiology, 145(1), 98 e 105.

ALVES, V. F. Ocorrência e controle de *Listeria monocytogenes* em pescado minimamente processado. 2005. 104f. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

ANDREWS W. (2002). Current State of Conventional Microbiological Methodology for the Examination of Food. In: Workshop 102–15. Microorganisms in Foods: Now What? American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.

ANONYMOUS, 2013. The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) for

2012. Commission. Available from: ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm. Accessed 2014 April 25.

ANONYMOUS. 2007. Microbiological guidelines for ready to eat food. Centre for Food Safety, Food and Environmental Hygiene Department, Hong Kong, China. Available from : http://www.cfs.gov.hk/english/food_leg/food_leg_mgref.html. Accessed 2014 April 25.

ARAÚJO, P.C.C. *Listeria monocytogenes*: Ocorrência, verificação da eficiência de dois meios de plaqueamento, sorovares predominantes e sensibilidade aos antimicrobianos de cepas isoladas em produtos de carne de peru comercializados na cidade de Niterói-RJ-Brasil. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Fluminense, UFF, p.01-90, Niterói, 1998.

AURELI P.; FIORUCCI G.C.; CAROLI D.; MARCHIARO G.; NOVARA O.; LEONE L.; SALMASO S.; 2000. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. N Engl J Med 342:1236–41.

BARBALHO, T.C.F; ALMEIDA, P.F.; ALMEIDA, R.C.C.; HOFER. E. Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid confirmation of suspect colonies. Food Control, v. 16, p. 211-216, 2005.

BARBAU-PIEDNOIR, E.; BOTTELDOORN, N.; YDE, M.; MAHILLON, J.; ROOSENS, N. H.; Development and validation of qualitative SYBR® Green real-time PCR for detection and discrimination of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1 e 17. (2012).

BASTI A. A.; MISAGHI A.; SALEHI T.Z.; KAMKAR A.; 2006. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. Food Control 17:183–8.

BENETTI, T.M.; MONTEIRO, C.L.B.; BEUX, M.R.; ABRAHÃO, W.M.; Comparison of selective agars recommended by method ISO 11290-1 and chromogenic agars for the isolation of *Listeria* sp. in

refrigerated sausages. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 48, n. 4, oct./dec., 2012.

BERTSCH, D.; RAU, J.; EUGSTER, M.R.; HAUG, M.C.; LAWSON, P.A.; LACROIX, C.; MEILE, L.; *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *Int J Syst Evol Microbiol* (2013) 63, 526–532.

BIOLIFE ITALIANA SRL. Technical Sheet N °401605-5 B E –5 12/2005 page 1- 3. 2005.

BOTTERO, M. T.; DALMASSO, A.; Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. *The Veterinary Journal*, v. 190, p. 34-38, 2011.

_____._____. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 09, de 08 de abril de 2009. Institui os Procedimentos de Controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, p.09, 09. Abr.2009 . Seção 1.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010. Brasília: MPA, 2010. 128p

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011. Brasília: MPA, 2011. 60p.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Consumo de pescado no Brasil aumenta 23,7% em dois anos. 2013. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/imprensa/noticias/2226-consumo-de-pescado-no-brasil-aumenta-237-em-dois-anos>>. Acesso em: 18 out. 2014.

BRETT M.S.Y.; SHORT P.; MCLAUCHLIN J.; A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *Intl J Food Microbiol* 43:223–9. 1998

BREMER P.; FLETCHER G.; OSBORNE C.; *Listeria monocytogenes* in seafood. New Zealand Institute for Crop and Food Research. Auckland, New Zealand. p 1–13. 2003.

BORTOLUSSI, R. Listeriosis: a primer. Canadian Medical Association Journal, v. 179, n. 8, p. 795-797, 2008.

CABANES, D. Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. Mol. Microbiol., v.51, n.6, p.1601-1614, 2004.

CATTANI, C. S. O. Ocorrência de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* isoladas em produtos cárneos suínos no estado de santa catarina, no período de 2007 a 2010. 2011. 52f. Dissertação (Mestrado no Curso de Pós-Graduação em Higiene, Inspeção e Tecnologia de Alimentos de Origem Animal) - Faculdade de Veterinária - Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2011.

CHAPELA, M. J. ; SOTELO, C. G.; PEREZ-MARTIN, R. I.; PARDO, M. A.; PEREZ-VILLAREAL, B.; GILARDI, P.; RIESE, J. Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification, Food Control, v. 18, p. 1211-1215, 2007.

CHEN, Y.; ROSS, W.H.; SCOTT, V.N.; GOMBAS, D.E.; (2003). *Listeria monocytogenes*. Low levels equal low risk. J. Food Prot., 66: 570-577.

CHIARINI, E.; TYLER, K.; FARBER, J. M.; PAGOTTO, F.; & DESTRO, M. T.; (2009). *Listeria monocytogenes* in two different poultry facilities: manual and automatic evisceration. Poultry Science, 88(4), 791 e 797.

CHUANG, P. S.; MENG-I.; CHENG; SHIAO, J. C.; Identification of tuna species by a real-time polymerase chain reaction technique. Food Chemistry, v.133, p.1055-1061, 2012.

CHURCHILL, R.L.T.; LEE, H.; HALL, J. C.; Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin in food. Journal Microbiology Methods, v.64, n.2, p.141-170, 2006.

CLARK, C. G.; FARBER, J.; PAGOTTO, F.; CIAMPA, N.; DORÉ, K.; NADON, C.; BERNARD, K.; NG, L.- K.; Surveillance for *Listeria monocytogenes* and listeriosis, 1995- 2004. Epidemiol. Infect., 138: 559-572. 2010.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T.; *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. Alimentos e Nutrição, Araraquara, v.19, n.2, p. 195-206, abr./jun., 2008.

DALMASSO, M.; BOLOCAN, A.S.; HERNANDEZ, M.; KAPETANAKOU, A.E.; KUČHTA, T.; MANIOS, S.G.; MELERO, B.; MINAROVÍČOVÁ, J.; MUHTEREM, M.; NICOLAU, A.I.; ROVIRA, J.; SKANDAMIS, P.N.; STESSL, B.; WAGNER, M.; JORDAN, K.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; Comparison of polymerase chain reaction methods and plating for analysis of enriched cultures of *Listeria monocytogenes* when using the ISO11290-1 method. Journal of Microbiological Methods 98 (2014) 8–14.

DRAUGHON, F.A.; ANTHONY, B. A.; DENTON, M.E.; *Listeria* species in fresh rainbow trout purchased from retail markets. Dairy, Food and Environmental Sanitation v. 19, p. 90-94, 1999.

DE CASTRO, V.; ESCUDERO, J. M.; RODRIGUEZ, J. L.; MUNIOZGUREN, N.; URIBARRI, J.; SAEZ, D.; Listeriosis outbreak caused by Latin-style fresh cheese, Bizkaia, Spain, Euro Surveillance, 17. pii: 20298. August 2012.

DELIBATO, E.; RODRIGUEZ LAZARO, D.; GIANFRANCESCHI, M.; DE CESARE, A.; COMIN, D.; GATTUSO, A.; European validation of real-time PCR method for detection of *Salmonella* spp. in pork meat. International Journal of Food Microbiology (2014).

DESTRO, M. T.; PIVA, F. C.; LEITÃO, M. F. F.; LANDGRAF, M.; 1994. Occurrence of *Listeria* sp. in shrimp from Brazilian processing plant. IN: 3rd INTERNATIONAL ASEPT CONFERENCE, FOOD SAFETY 94. 1994. p.330.

ERICSSON, H.; EKLOW, A.; DANIELSSONTHAM M.L.; LONCAREVIC S.; MENTZING L.O.; PERSSON I.; UNNERSTAD H.; THAM W.; An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. J Clin Microbiol 35: 2904–7. 1997.

FACINELLI, B.; VARALDO, P.E.; TONI, M.; CASOLARI, C.; FABIO, U.; Ignorance about *Listeria*. Br Med J299:738. 1989

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization). (2004a). Proposed draft guidelines on the application of general principles of food hygiene to the [control] of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Available at: ftp://ftp.fao.org/codex/ccfh37/fh37_05e.pdf (Accessed on August 31, 2014).

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization). (2004b). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Available at: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/mra4.pdf> (Accessed on August 20, 2014).

FARBER, J.M.; DALEY, E.M.; MACKIE, M.T.; LIMERICK, B.; A small outbreak of listeriosis potentially linked to the consumption of imitation crab meat. *Lett Appl Microbiol* 31:100–4. 2000.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) 2011. Fish and fishery products hazards and controls guidance. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration USA. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/food/guidanceregulation/ucm251970.pdf>. Accessed 2014 April 25.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). *Bad Bug Book* (Second Edition). Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook - Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN), U.S. Department of Health and Human Services, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *Food outlook: biannual report on global food markets*. Rome: FAO, 2013. 134p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *The state of world fisheries and aquaculture 2012*. Rome: FAO, 2012. 209p.

FORSYTHE, S. J.; *The Microbiology of Safe Food*. 2nd. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. 496p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M.; *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo, Editora Atheneu, 2003;

FRETZ, R.; SAGEL, U.; RUPPITSCH, W.; PIETZKA, A.; STOGER, A.; HUHULESCU, S.; Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese Quargel, Austria and Germany 2009. *Euro Surveill*, 15, 19477.

FSANZ. 2001. Guidelines for the microbiological examination of ready-to-eat foods. Food Standards Australia New Zealand. Available from: <http://www.foodstandards.gov.au/publications/pages/guidelinesformicrobi1306.aspx>. Accessed 2014 April 25.

GHANBARI , J. M.; DOMIG K. J.; KNEIFEL W.; Seafood biopreservation by lactic acid bacteria – a review. *LWT – Food Sci Technol* 50(2):315–24. 2013.

GALIMBERTI, A.; DE MATTIA, F.; LOSA, A.; BRUNI, I.; FEDERICI, S.; CASIRAGHI, M.; MARTELOS, S.; LABRA, M. DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International*, v. 50, p. 55-63, 2013.

GAMBARIN, P.; MAGNABOSCO, C.; LOSIO, M.N.; PAVONI, E.; GATTUSO, A.; ARCANGELI, G.; FAVRETTI, M.; *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood and potential hazards for the consumers. *Intl J Microbiol* (2012) (Article ID 497635). doi: 10.1155/2012/497635.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L.; *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. Journal. Food Microbiology*, v.113, p.1-15, 2007.

GARRIDO V, GARCIA-JALON I, VITAS AI. Temperature distribution in Spanish domestic refrigerators and its effect on *Listeria monocytogenes* growth in sliced ready-to-eat ham. *Food Control*. 2010; 21:896-901.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P. M.; Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *Microbiology Reviews*, v. 29, p. 851–875, 2005.

GAULIN, C.; RAMSAY, D.; (2010). Rapport d'investigation et d'intervention à la suite de l'éclosion d'infections à *Listeria monocytogenes* pulsovar 93 liée à la consommation de fromages québécois, 2008. Available at: <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/Rapporteclosionlisteriose.pdf> (Accessed on November 4 21, 2011).

GIBBONS, I.; ADESIYUN, A.; SEEPERSADSINGH, N.; RAHAMAN, S. Investigation for possible source(s) of contamination of ready-to-eat meat products with *Listeria spp.* and other pathogens in a meat processing plant in Trinidad. *Food Microbiology*, v. 23, p. 359–366, 2006.

GOMBAS, D.E.; CHEN, Y.; CLAVERO, R.S.; SCOTT, V.N.; (2003). Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *J. Food Prot.*, 66: 559-569.

GONZALEZ, D.; VITAS, A.I.; DÍEZ-LETURIA, M.; GARCÍA-JALÓN, I.; *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood in Spain: Study of prevalence and temperatures at retail. *Food Microbiology*, v.36, Issue 2, December 2013, Pages 374–378

GONÇALVES, P.M.R. Isolamento e identificação de *Listeria spp.* a partir de amostras de cortes de peito de frango congelados: avaliação de metodologias e fatores interferentes. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal). Universidade Federal Fluminense, UFF, p.01-111, Niterói, 1998.

GONÇALVES, A. A.; Tecnologia do Pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação. 1º edição; Editora: Atheneu, 2011.

GOULET, V.; HEDBERG, C.; LE MONNIER, A.; DE VALK, H.; (2008). Increasing incidence of listeriosis in France and other European Countries. *Emerg. Infect. Dis.*, 14: 734-740.

GUDMUNSDOTTIR, S.; GUDBJORNSDOTTIR, B.; EINARSSON, H.; KRISTINSSON, K.G.; KRISTJANSSON, M.; Contamination of cooked peeled shrimp (*Pandalus borealis*) by *Listeria monocytogenes* during processing at two processing plants. *J Food Prot* 69:1304–11. 2006.

HAGE, E.; MPAMUGO, O.; OHAI, C.; SAPKOTA, S.; SWIFT, C.; WOOLDRIDGE, D.; AMAR, C.F.L.; Identification of six *Listeria* species by real-time PCR assay. doi:10.1111/lam.12223 Applied Microbiology, January 2014.

HATAKKA, M.; JOHANSSON, T.; LYYTIK AINEN, O.; SIITONEN, A.; Listeriosis cases suspected to have been caused by vacuum-packed fish products in Finland. Euro Surveill 4(15):16–23. 2000.

HEALTH CANADA. (2010). It's Your Health "*Listeria* and food safety". Available at: <http://www.hc-sc.gc.ca/hl-vs/iyh-vsv/food-aliment/listeria-eng.php> (Accessed on August 31, 2014).

HEALTH CANADA. (2011). Policy on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Bureau of Microbial Hazards, Food Directorate, Health Products and Food Branch, Health Canada. Available from: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/pol/policy_listeria_monocytogenes_2011-eng.php. Accessed 2014 May 31.

HELLBERG, R. S.; MORRISEY, M. T.; Advances in DNA-Based Techniques for the Detection of Seafood Species Substitution on the Commercial Market. Journal of Laboratory Automation v.16. p. 308-321, 2011.

HOLLAND, P.M.; ABRAMSON, R.D.; WATSON, R.; GELFLAND, D.H. 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, 88: 7276-7280, 1991.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in food 6. Microbial Ecology of food commodities 2^a ed. 2005.

INOUE, S.; NAKAMA, A.; ARAI, Y.; KOKUBO, Y.; MARUYAMA, T.; SAITO, A.; YOSHIDA, T.; TERAOKA, M.; YAMAMOTO, S.; KUMAGAI, S. Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan. International Journal of Food Microbiology v. 59, p. 73-77. 2000.

ISO 11290-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* — Part 1: Detection method. 1996.

JACQUET, C. Expression of ActA, Ami, InlB and Listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 62, n. 2, p. 616-622, 2002.

JADHAV, S.; BHAVE, M.; PALOMBO, E. A. (2012). Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. Journal of Microbiological Methods, 88(3), 327.

JAMI, M.; GHANBARI, M.; ZUNABOVIC, M.; DOMIG, K. J.; KNEIFEL, W. *Listeria monocytogenes* in Aquatic Food Products—A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Vol.13, 2014.

JEYALETCHUMI, P.; TUNUNG, R.; MARGARET, S. P.; SON, R., FARINAZLEEN, M. G.; CHEAH, Y. K.; Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. International Food Research Journal 17: 1-11 (2010a).

JEYALETCHUMI, P.; TUNUNG, R.; MARGARET, S. P.; SON, R.; GHAZALI, F. M.; CHEAH, Y. K.; NISHIBUCHI, M.; NAKAGUCHI, Y.; MALAKAR, P. K.; Quantification of *Listeria monocytogenes* in salad vegetables by MPN-PCR. International Food Research Journal 17: 281-286 (2010b).

KAMP, H. D.; HIGGINS, D. E.; A protein thermometer controls temperature-dependent transcription of flagellar motility genes in *Listeria monocytogenes*. Plos Pathogens, v. 7, n.8, e1002153, agosto 2011.

KARAKOLEV, R.; Incidence of *Listeria monocytogenes* in beef, pork, raw-dried and raw-smoked sausages in Bulgaria. *Food Control* , v. 20, p. 953–955, 2009..

KESMEN, Z.; GULLUCE, A.; SAHIN, F; YETIM, H. Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. Meat Science, v. 82, p.444-449, 2009.

KOVAČEVIĆ, J.; MESAK, L.R.; ALLEN, K.J.; Occurrence and characterization of *Listeria* spp. in ready-to-eat retail foods from Vancouver, British Columbia Food Microbiology. Volume 30, Issue 2, June 2012, Pages 372–378

LANG H.E.; NEUHAUS, K. E SCHERER, S. *Listeria* weihenstephanensis sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *Int J SystEvol Microbiol* 63(2013), 641–647.

LE MONNIER, A. Diagnosis of *Listeria monocytogenes* Meningoencephalitis by Real- Time PCR for the *hly* Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, D. C., v. 49, n. 11, p. 3917- 3923, novembro 2011.

LENNON, D.; LEWIS, B.; MANTELL, C.; BECROFT, D.; DOVE, B.; FARMER, K.; TONKIN, S.; YEATES, N.; STAMP, R.; MICKLESON, K.; Epidemic perinatal listeriosis. *Pediatr Infect Dis J* 3:30–4. 1984.

LIANOU, A.; SOFOS, J. N. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *Journal of Food Protection*, v. 70, n. 9, p. 2172-2198, 2007.

LIN, W. F.; SHIAU, C.Y.; HWANG, D.F. Identification of four *Thunnus* tuna species using mitochondrial cytochromed gene sequence and PCR-RFLP analysis. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 13, p. 383-388, 2005.

LITTLE, C.L.; SAGOO, S.K.; GILLESPIE, I. A.; GRANT, K.; MCLAUCHLIN, J.; (2009). Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in selected retail ready-to-eat foods in the United Kingdom. *J. Food Prot.*, 72: 1869-1877.

LOFFELHOZ, M.; DENG, H. PCR and Its Variations. In: Tang, Y. W., Stratton, C., editors. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Nashville: Springer US. p. 166-183, 2006.

LOPEZ-ANDREO M.; ALDEGUER, M.; GUILLÉN,I.; GABALDÓN, J.A.; PUYET, A. Detection and quantification of meat species by qPCR

in heat-processed food containing highly fragmented DNA. Food Chemistry, v. 134, p.518-523, 2012.

MCLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R.T.; SMERDON, W.J.; JEWELL, K.; *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. Int. J. Food Microbiol., 92: 15-33, 2004.

MEEKS, K.D.; SIEVE, A.N.; KOLLS, J.K.; GHILARDI, N.; BERG, R.E.; IL-23 Is Required for Protection against Systemic Infection with *Listeria monocytogenes*. Journal of Immunology, 183: 8026-8034, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - MS, 2005. Guia alimentar para a população brasileira, promovendo a alimentação saudável, Brasília – DF; 2005. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/familia/temasdocumentosdetalhe.cfm?id=60&iddoc=166>>. Acesso em 14 nov 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). Morbidade hospitalar do SUS., Brasília, 2014. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sih/cnv/mi>>. Acesso em 6 out 2014.

MIETTINEN, M.K.; SIITONEN, A.; HEISKANEN, P.; HAAJANEN, H.; BJORKROTH, K.J.; KORKEALA, H.J.; 1999. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. J Clin Microbiol 37:2358–60.

MIYASAKI, K.N.; CHIARINI, Eb.; SANTÁNA, A.S.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M. High prevalence, low conts and uncommon serotypes of *Listeria monocytogenes* in Linguiça, a Brazilian fresh pork sausage. *Meat Science* ,n.83, p. 523-527, 2009.

MISRACHI, A.; WATSON, A.J.; COLEMAN, D.; *Listeria* in smoked mussels in Tasmania. *Commun Dis Intell* 15:427. 1991.

MONTEIRO, L.R.L.; MEDEIROS, N.X.; MESQUITA, A.J. *L. monocytogenes* em carne bovina moída crua comercializada em Araguaína, TO. Revista Higiene Alimentar, v.23, n.170/171, p.352, Especial IV Congresso Latino Americano de Higienistas de Alimentos, Florianópolis, 2009.

NEAL, J.A. Comparative analysis of training delivery methods for new employees cleaning and sanitizing retail deli slicers: An exploratory study. Food control, v.29, p.149-155, 2013.

NEETOO, H.; MU, YE; HAIQIANG, CHEN; ROLF, D. Use of nisin-coated plastic films to control *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged cold-smoked salmon. International Journal of Food Microbiology, v.122, p. 8–15, 2008.

NORHANA, M. N. W.; POOLE, S. E.; DEETH, H. C.; DYKES, G. A.; Prevalence, persistence and control of salmonella and *Listeria* in shrimp and shrimp products: a review. Food Control (2010). 21:343–61.

O'GRADY, J.; SEDANO-BALBÁS, S.; MAHER, M.; SMITH, T.; BARRY, T.; Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target. Food Microbiol. 25, 75–84. 2008.

OIE- World Organisation for Animal Health Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014 (May,2014). Chapter 2.9.7 *Listeria monocytogenes*. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.07_LISTERIA_MONO.pdf. Acessado em: 03jan2015.

OLIVEIRA, A. M.; ABEID RIBEIRO, E.G.; MORATO BERGAMINI, A.M.; PEREIRA DE MARTINIS, E.C.; Quantification of *Listeria monocytogenes* in minimally processed leafy vegetables using a combined method based on enrichment and 16S rRNA real-time PCR. Food Microbiol. 27, 19–23. 2010

OMS. Organização Mundial de Saúde. Zoonoses and veterinary public health/ Fact sheets. Programmes and projects, 2009. Disponível em: < <http://www.who.int/entity/en/> >. Acesso em: maio de 2014

ORAVCOVÁ, K.; KUČHTA, T.; KACLÍKOVÁ, E.; A novel real-time PCR-based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 568–573. 2007.

OPAS . Organização Pan-Americana da Saúde. Perspectiva sobre a análise de risco na segurança dos alimentos: Curso de sensibilização. Rio de Janeiro: Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças - OPAS/OMS, 2008. 160p. Disponível em: <http://bvs.panalimentos.org/local/File/Apostila_Final_12_08_2008.pdf> Acesso em: 17 outubro de 2014

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer. Brasília, 2008. 276p.

PAGADALA, S.; PARVEEN, S.; RIPPEN, T.; LUCHANSKY, J. B.; SCHWARZ, J.G.; Comparison of Automated BAX PCR and Standard Culture Methods for Detection of *Listeria monocytogenes* in Blue Crabmeat (*Callinectes sapidus*) and Blue Crab Processing Plants. *Journal of Food Protection*, Vol. 74, No. 11, Pages 1930–1933 doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-213. 2011.

PAGADALA, S.; PARVEEN, S.; RIPPEN, T.; LUCHANSKY, J. B.; CALL J. E.; TAMPLIN, M. L.; PORTO-FETT A. C.S.; Prevalence, characterization and sources of *Listeria monocytogenes* in blue crab (*Callinectes sapidus*) meat and blue crab processing plants *Food Microbiology* 31 263e270 (2012).

PHAC (Public Health Agency of Canada). (2007). Public Health Agency of Canada Strategic Plan 2007-2012, Information - Knowledge - Action. Available at: <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/2007/sp-ps/index-eng.php> (Accessed on November 30, 2014).

PHAC (Public Health Agency of Canada). (2009a). *Listeria monocytogenes* outbreak. Available at: http://www.phac-aspc.gc.ca/alert-alerte/listeria/listeria_2009-eng.php (Accessed on November 30, 2014).

PHAC (Public Health Agency of Canada). (2009b). *Listeria monocytogenes* outbreak. Available at: http://www.phac-aspc.gc.ca/alert-alerte/listeria/listeria_2009-eng.php (Accessed on November 30, 2014).

PHAC (Public Health Agency of Canada). (2010). Update to 2008 *Listeria monocytogenes* case numbers. Available at: http://www.phac-aspc.gc.ca/alert-alerte/listeria/listeria_20100413-eng.php (Accessed on November 30, 2014).

PESAVENTO, G.; DUCCI, B.; NIERI, D.; COMODO, N.; LO NOSTRO, A.; Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. *Food Control*, (2010). 21, 708e713.

POSTOLLEC, F.; FALENTIN, H.; PAVAN, S.; COMBRISSE, J.; SOHIER, D.; Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiol.* 28, 848–861. 2011.

RANTSIOU, K.; ALESSANDRIA, V.; URSO, R.; DOLCIP, P.; COCOLIN, L.; Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 121 (2008) 99–105.

REGULATION (EC) N° 1441/2007 amending Regulation (EC) No. 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. 05 December 2007. Official Journal of the European Union L 322, 7 December 2007, pp. 12-29.

REIJ, M.W.; DEN, A.; ANTREKKER, E.D.; Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *Intl J Food Microbiol* 91:1–11. 2004.

RIEDO, F.X.; PINNER, R.W.; TOSCA, M.D.; CARTTER, M.L.; GRAVES, L.M.; REEVES, M.W.; WEAVER, R.E.; PLIKAYTIS, B.D.; BROOME, C.V.; A point-source foodborne listeriosis outbreak – documented incubation period and possible mild illness. *J Infect Dis* 170:693–6. 1994.

ROCOURT J. 1991. Human listeriosis — 1989. WHO/HPP/FOS/91.3. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

ROBERTS, A. J.; WILLIAMS, S. K.; WIEDMANN, M.; NIGHTINGALE, K. K.; ICROBIOL, A. P. P. L. E. N. M.; Some *Listeria monocytogenes* Outbreak Strains Demonstrate Significantly

Reduced Invasion , inlA Transcript Levels , and Swarming Motility In Vitro □. *Applied and Environment Microbiology* 2009, 5647-5658.

ROCOURT, J.; BENEMBAREK, P.; TOYOFUKU, H.; SCHLUNDT, J.; Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. *Fems Immunol Med Microbiol* 35:263–7. 2003.

RODRÍGUEZ-LAZARO, D.; COOK, N.; HERNANDEZ, M. (2013). Real-time PCR in food science: PCR diagnostics. *Current Issues in Molecular Biology*, 15(2), 39 e 44.

RODRIGUEZ D -LAZARO, M.; HERNANDEZ, M.; SCORTTI, T.; ESTEVE, J. A.; VAZQUEZ-BOLAND; M. PLA.; Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* targets and AmpliFluor technology,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 3, pp. 1366–1377, (2004a).

RODRÍGUEZ-LAZARO, D.; JOFRE, A.; AYMERICH, T.; HUGAS, M.; PLA, M. (2004b). Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 6299e6301.

ROHDE, A.; HAMMERL, J. A.; APPEL, B.; DIECKMANN, R.; AL DAHOUK, S.; FISHing for bacteria in food – A promising tool for the reliable detection of pathogenic bacteria. *Food Microbiology*. Volume 46, April 2015, Pages 395–407.

ROSSMANITH, P.; WAGNER, M.; The challenge to quantify *Listeria monocytogenes* — a model leading to new aspects in molecular biological food pathogen detection. *J. Appl. Microbiol.* 110, 605–617. 2011.

RUSSO,P.; BOTTICELLA, G.; CAPOZZI, V.; MASSA, S.; SPANO, G. E BENEDEUCE, L.; A Fast, Reliable, and Sensitive Method for Detection and Quantification of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Ready-to-Eat Fresh-Cut Products by MPN-qPCR. *BioMed Research International*, Volume 2014, Article ID 608296, 9 pages

SALLES, M. A. F.; SILVA, P. K. S.; FONSECA, S.; REIS, V.; CARNEIRO, A. L.; BRANCO, F. R.; SILVA, P. L.; CUNHA, A. P. Pesquisa de *Salmonella* sp através de provas de triagem rápida e convencional, em carcaças de frangos abatidos no município de Uberlândia, MG. Revista Higiene Alimentar, v. 92, nº 92/93, p. 3640, 2002.

SCALLAN, E.R. M.; HOEKSTRA, F. J.; ANGULO, R. V.; TAUXE, M. A.; WIDDOWSON, S. L.; ROY, J. L.; JONES, P.; GRIFFIN, M. 2011. Foodborne Illness Acquired in the United States – Major Pathogens. Emerg. Infect. Dis. 17:7-15.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. A. C.; SILVEIRA, F. A. Métodos de análises microbiológicas de alimentos. Manual técnico ITAL n. 14, Campinas, p. 135- 141. 2007.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde (Ministério da Saúde; Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN net), Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília, 2014.

SCHODER, D.; ROSSMANITH, P.; GLASER, K.; WAGNER, M.; Fluctuation in contamination dynamics of *L. monocytogenes* in quargel (acid curd cheese) lots recalled during the multinational listeriosis outbreak 2009/2010. Int. J. Food Microbiol. 157, 326–331. 2012.

SWAMINATHAN, B.; CABANES, D.; ZHANG, W.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L. R. *Food Microbiology*. Washington, D.C.: Fundamentals and Frontiers, 2007, p. 457-492.

TILNEY, L. G.; PORTNOY, D. A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. J. Cell. Biol., v.109, n.4 Pt 1, p.1597-1608, 1989.

USHA, M. R.; TUNUNG, R.; CHAI, L. C.; GHAZALI, F. M.; CHEAH, Y. K.; NISHIBUCHI, M.; SON, R. A study on *Campylobacter jejuni* cross-contamination during chilled broiler preparation. International Food Research Journal 17: 107-115 (2010).

UYTTENDAELE, M. Prevalence and challenge tests of *Listeria monocytogenes* in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, p. 94-104, 2009.

ZHU, M.; DU, M.; CORDRAY, J.; AHN, D.U.; Control of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat meat products. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 4:34–42 (2005).

WARRINER, K.; NAMVAR, A. (2009). What is the hysteria with *Listeria* Trends in Food Science & Technology, 20(6e7), 245 e 254.

CAPÍTULO II

DETECÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM PRODUTOS A BASE DE PESCADO E COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE PCR EM TEMPO REAL E ISO11290-1

INTRODUÇÃO

O consumo de produtos do mar aumentou recentemente devido ao aumento da conscientização dos consumidores sobre nutrição e alimentação de qualidade. Frutos do mar são excelentes fontes de proteína de alta qualidade e contêm lipídios com altos níveis de ácidos graxos insaturados, que são requeridas para reduzir o risco de doença cardiovascular. Além disso, os produtos de pescado tendem a ser de fácil digestão, além de uma boa fonte de vitaminas e minerais (GHANBARI et al., 2013).

Por ter grande parte dos produtos do mar originários de países em desenvolvimento, há uma significativa preocupação quanto à segurança alimentar desses produtos. Isso levou a criação de normas oficiais e a execução de procedimentos regulamentares para a produção de frutos do mar. A proliferação global de patógenos através de produtos de pescado é considerada uma preocupante ameaça (NORHANA et al., 2010).

Até pouco tempo o conceito mundial de segurança alimentar era limitado ao abastecimento de alimentos na quantidade apropriada, mas, de acordo com o Ministério da Saúde, este conceito vem sendo ampliado, incorporando além do acesso universal aos alimentos, o aspecto nutricional e a sua qualidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

As infecções causadas pelo consumo de alimentos contaminados são um grande desafio para a Saúde Pública e para a economia (SERGELIDIS; ABRAHIM, 2009). O número de casos e a gravidade de doenças causadas por agentes transmitidos por alimentos têm aumentado consideravelmente o interesse da população em relação à segurança alimentar (BURLINGAME; PINEIRO, 2007; KLETER; MARVIN, 2008; WHO, 2008).

Dentre os patógenos de origem alimentar destaca-se atualmente a bactéria *L. monocytogenes* causadora da doença denominada listeriose, que apresenta alta letalidade (cerca de 25%), principalmente para indivíduos imunocomprometidos, recém-nascidos, mulheres grávidas e idosos (BARBALHO et al., 2005; DOGANAY, 2003). Além disso, *L. monocytogenes* também apresenta capacidade de

formar biofilmes nas plantas de processamento de indústrias de alimentos, facilitando desta forma a contaminação das superfícies de contato e conseqüentemente, dos alimentos processados (TRACHOO, 2003).

Vários surtos de listeriose têm ocorrido ao longo das últimas duas décadas, e apesar da *L. monocytogenes* ter sido observada numa grande variedade de alimentos, a maior ameaça deste patógeno é associado com produtos refrigerados que têm uma vida útil longa e produtos que são geralmente consumidos com pouco ou nenhum aquecimento anterior (BREMER et al., 2003).

Os frutos do mar são os primeiros entre este grupo de alto risco dos alimentos prontos para o consumo (RTE) (ROCCOURT et al., 2003 ; REIJ et al., 2004). Considerando a significativa implicação da listeriose para a saúde pública e da importância dos produtos do mar como um veículo para transmissão de *L. monocytogenes*, é importante conhecer a incidência deste patógeno nestes produtos.

Os métodos convencionais para a recuperação de *L. monocytogenes* costumam levar de cinco a sete dias para obter um resultado positivo definitivo. O desenvolvimento de métodos de detecção rápidos, sensíveis e confiáveis para detecção e quantificação de *L. monocytogenes* é muito importante para a indústria de alimentos, principalmente para produtos com vida útil limitada (PAGADALA et al., 2011).

A utilização desses métodos rápidos e mais confiáveis traz benefícios a toda cadeia produtiva de pescado, principalmente ao consumidor final. Dessa forma, pesquisas sobre a ocorrência de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo tornou-se cada vez mais importante, sobretudo tendo em conta que os produtos envolvidos nos surtos e casos esporádicos de listeriose são predominantemente alimentos processados refrigerados e com longa vida de prateleira (BENETTI et al., 2012).

Além disso, embora *L. monocytogenes* seja amplamente estudada, os dados da literatura são bastante escassos quanto a sua ocorrência em produtos de pescado, o que também justifica a realização deste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Detecção de *L. monocytogenes* em produtos a base de pescado por PCR em tempo real e através do método ISO 11290-1.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a qualidade dos produtos a base de pescado.
- Detectar *L. monocytogenes* em produto a base de pescado através do método ISO 11290-1.
- Detectar *L. monocytogenes* em produto a base de pescado através de PCR em tempo real utilizando um protocolo comercial.
- Detectar *L. monocytogenes* em produto a base de pescado através de PCR em tempo real utilizando um protocolo *in house*.
- Testar a especificidade do protocolo *in house* do método de PCR em tempo real.
- Comparar a eficiência dos métodos PCR em tempo real por kit comercial e ISO 11290-1.
- Comparar a eficiência dos métodos PCR em tempo real *in house* e ISO 11290-1.
- Comparar a eficiência dos métodos PCR em tempo real *in house* e PCR em tempo real por kit comercial.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Todas as amostras foram coletadas no comércio da região litorânea do estado de Santa Catarina, durante o mês de julho de dois mil e quatorze. Ao todo foram coletadas noventa amostras de produtos prontos ou pré-prontos para o consumo, a base de pescados. Entre as noventa amostras, foram coletados nove diferentes tipos de produtos, sendo dez amostras de cada um, com a maior variabilidade possível entre marcas e lotes, conforme demonstra a **Tabela 04**.

Tabela 04: Descrição do tipo de produtos e quantidade de amostras coletadas.

Tipo de Produto de Pescado	Categoria	Quantidade
Pizza de Atum	Pré-pronto para o consumo	10 amostras
Kani	Pronto para o consumo	10 amostras
Bolinho de Bacalhau	Pré-pronto para o consumo	10 amostras
Bolinho de Peixe	Pré-pronto para o consumo	10 amostras
Hambúrguer de Peixe	Pré-pronto para o consumo	10 amostras
Marisco cozido	Pronto para o consumo	10 amostras
Filé de peixe empanado	Pré-pronto para o consumo	10 amostras
Nuggets de merluza	Pré-pronto para o consumo	10 amostras
Nuggets Kids	Pré-pronto para o consumo	10 amostras
TOTAL		90 amostras

3.2 Detecção de *Listeria monocytogenes* através da **metodologia ISO 11290-1**

3.2.1 Enriquecimento seletivo primário

Foram pesadas, asépticamente, vinte e cinco gramas de amostra em um saco estéril, sendo posteriormente adicionado 225g de meio HALF FRASER (suplementado conforme a **Tabela 05**) em temperatura ambiente.

Tabela 05: Volume das soluções por litro de meio base para a suplementação dos caldos de enriquecimento para *Listeria*.

Meio base	HALF FRASER	FRASER
Ácido nalidíxico 10g.L ⁻¹	1,0mL	2,0mL
Acriflavina 2,5 g.L ⁻¹	5,0mL	10mL
Citrato férrico amoniacal 50 g.L ⁻¹	10mL	10mL

FONTE: ISO 11290-1 (1996)

As amostras após colocadas em saco estéril foram identificadas e homogenizadas no equipamento Bag Mixer® por

noventa segundos. Após, as mesmas foram incubadas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

3.2.2 Enriquecimento seletivo secundário

Após a incubação, foi transferido 0,1mL da cultura obtida no primeiro enriquecimento seletivo para um tubo contendo 10mL de FRASER suplementado (**Tabela 5**). Foi incubado a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

3.2.3 Plaqueamento seletivo

Com o auxílio de uma alça, foi transferido um inóculo de cada uma das 90 culturas obtida no Caldo FRASER para a superfície de uma placa de ALOA e outra de LSA. Os meios foram incubados a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, sendo realizada uma leitura prévias após 24 horas.

3.2.4 Leitura e triagem de colônias típicas

No agar ALOA, foi considerado como colônias típicas de *L. monocytogenes* as colônias azul-esverdeadas rodeadas por um halo opaco. As demais espécies de *Listeria* aparecem como colônias azul-esverdeadas sem halo opaco.

No agar LSA, foi considerado como típicas de *L. monocytogenes* as colônias de cerca de 2mm de diâmetro, escuras com ou sem brilho esverdeado, com halos enegrecidos e centro côncavo.

Foram selecionadas até 5 colônias típicas de cada placa e estriadas na superfície de placas de TSA/YE (ÁGAR TRIPTICASE DE SOJA COM EXTRATO DE LEVEDURA), previamente secas, de forma a obter colônias isoladas. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Quando não havia colônias típicas o teste foi considerado negativo para *L. monocytogenes*.

No TSA/YE foram selecionadas as colônias típicas, ou seja, as que possuem diâmetro de 1mm a 2mm, convexas, incolores e opacas com borda lisa.

3.2.5 Confirmação de *Listeria* spp.

3.2.5.1 Reação de catalase

Foi selecionada uma colônia obtida a partir do TSA/YE e suspendida numa solução de peróxido de hidrogênio numa placa de Petri. O imediato desprendimento de gás indica reação positiva.

3.2.5.2 Coloração de gram

Foi realizada a coloração de Gram a partir de uma colônia obtida do TSA/YE para verificar as características da *Listeria*: Gram-positivas, bastonetes curtos e finos.

3.2.5.3 Teste de motilidade

Após selecionar uma colônia isolada obtida no TSA/YE, usando uma agulha de inoculação, foi perfurado o Àgar Motilidade e incubado por 5 dias a 25°C. Para leitura, foi verificado o crescimento ao redor da perfuração, sendo que *Listeria* spp são móveis, com crescimento em forma de guarda-chuva.

3.2.6 Confirmação de *Listeria monocytogenes*

3.2.6.1 Teste de hemólise

Foi selecionada uma colônia obtida no TSA/YE e, usando uma agulha, foi realizada uma picada na placa de AS (AGAR SANGUE). Simultaneamente, foi picada uma cultura positiva (*L. monocytogenes*) e uma negativa (*L. innocua*) para serem utilizadas como controles.

Depois de incubado a 37°C por 24h, foi examinado as cepas em teste e os controles, considerando que: *L. monocytogenes* mostra zona da picada restrita, limpa, com halo claro (β -hemólise); *L. innocua* não forma zona clara ao redor da picada. *L. seeligeri* forma uma zona fraca de hemólise. *L. ivanovii* usualmente forma uma picada grande, limpa, delineada por zona de β -hemólise. As placas foram examinadas contra a luz para comparar as culturas em teste com os controles (**Tabela 6**).

3.2.6.2 Utilização de carboidratos

Foi transferida, a partir do TSA/YE, uma colônia suspeita para 2 tubos de CPB (CALDO PÚRPURA DE BROMOCRESOL), adicionados respectivamente, de xilose e ramnose, a fim de obter uma concentração final de 0,5% e incubado a 37°C por até 5 dias.

Foi realizada a leitura, considerando que a viragem de cor do indicador púrpura de bromocresol para amarelo indica a fermentação do açúcar presente. A *L. monocytogenes* fermenta a ramnose e não fermenta a xilose. A *L. ivanovii* não fermenta a ramnose e fermenta a xilose (**Tabela 06**).

3.2.6.3 CAMP teste

Foram estriadas culturas de *Staphylococcus aureus* e *Rhodococcus equi* em linhas através da placa de AS de forma que as duas culturas estejam paralelas e em diâmetros opostos. Foram, então estriadas as culturas obtidas a partir do TSA/YE perpendicularmente às culturas descritas acima, mantendo uma distância de 1 - 2 mm destas.

Simultaneamente, foram semeadas culturas controle de *L. monocytogenes* e *L. innocua* e todas as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Considerou-se reação positiva quando houve a presença de uma zona de α -hemólise aumentada na intersecção entre as linhagens-teste e as linhagens de *S. aureus* e *Rhodococcus equi*.

Levou-se em conta que: a reação positiva com *R. equi* é vista como uma ampla área de hemólise (5 - 10 mm) em forma de ponta-de-seta. A reação foi considerada negativa quando apenas uma pequena e fraca zona de hemólise se estende por cerca de 1 mm ao longo da zona de intersecção da cultura-teste com a zona de difusão de *R. equi*.

Já a reação positiva com *S. aureus* foi considerada quando uma pequena zona de hemólise aumentada estendendo-se por cerca de 2 mm ao longo da linhagem-teste e na área de baixa hemólise gerada pelo crescimento de *S. aureus* foi observada.

Só foram consideradas como positivas para *Listeria monocytogenes* as amostras que apresentaram colônias típicas nas placas de ALOA e LSA, apresentaram-se como bastonetes pequenos gram positivos, catalase positivos e móveis. CAMP teste positivo *S. aureus*, CAMP teste negativo *R. equi* hemolíticas, xilose negativa e ramnose positiva, conforme resumido na **Tabela 06**.

Tabela 06: Reações para identificação de *Listeria spp.*

	Hemólise		Produção de ácido		Teste CAMP	
	Ramnose	Xilose	<i>S. aureus</i>	<i>E. equi</i>		
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-		
<i>L. innocua</i>	V	-	-	-		
<i>L. seeligeri</i>	-	+	-	+		
<i>L. ivanovii</i>	(+)	+	(+)	-		
<i>L. welshimeri</i>	-	+	-	-		
<i>L. grayi</i> subsp. <i>Grayi</i>	-	-	-	-		
<i>L. grayi</i> subsp. <i>Murrayi</i>	V	-	-	-		

V: Reação variável

(+) : Reação fraca

+ : Mais de 90% de reações positivas

- : Sem reação

Fonte: ISO 11290-1 (1996).

3.2.7 Expressão dos resultados

O resultado foi expresso como: Presença ou Ausência de *L. monocytogenes* em 25 g ou mL.

3.3 Detecção de *L. monocytogenes* através da metodologia de PCR em tempo real

3.3.1 Preparo das amostras

Para a realização dos dois protocolos de PCR em tempo real, foi retirada uma alíquota de 1ml da cultura obtida após o período de incubação da etapa “enriquecimento seletivo primário” utilizado na metodologia ISO11290-1. Essa alíquota foi transferida assepticamente para um microtubo de 2 ml identificado e foi realizada uma centrifugação de 5000_xg por 10 minutos, conforme o protocolo do Kit de extração de DNA DNeasy Mericon Blood and Tissue® (Qiagen). Então o sobrenadante foi desprezado e o pellet mantido.

3.3.2 Extração do DNA genômico

A extração de DNA das amostras foi realizada com o uso do Kit de extração de DNA de alimentos DNeasy Mericon Blood and Tissue® (Qiagen). Todas as extrações foram no equipamento QIAcube® (Qiagen) no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O mesmo DNA extraído foi utilizado para a aplicação dos dois protocolos de PCR em tempo real.

O DNA extraído foi eluído em tampão TE (tampão de eluição do kit, contendo Tris 10 mM com pH entre 8 e 9) em um volume final de 100 uL, o qual foi mantido a -20°C até a realização das reações de PCR em tempo real.

3.3.3 PCR em tempo real

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) por meio do uso do equipamento de PCR Real Time Rotor Gene Q® (Qiagen). O preparo do mix de PCR foi realizado em capela de fluxo laminar.

3.3.4 Protocolo de PCR em tempo real através de uso de kit comercial Mericon *Listeria monocytogenes* Kit® (Qiagen)

O Kit Mericon *Listeria monocytogenes* Kit® (Qiagen) acompanha: Master Mix completo com *primers* e sonda TaqMan®, controle positivo para *L. monocytogenes* e controle negativo da reação.

3.3.4.1 Teste preliminar

Foi realizado um teste preliminar para o Mericon *Listeria monocytogenes* Kit® (Qiagen) a fim de avaliar as condições da PCR e de preparo do mix. Foi utilizado para o teste, DNA de cepa de *L. monocytogenes* (ATCC19111), o controle positivo do kit, o controle negativo de reação do kit e um DNA de cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922) como controle negativo.

3.3.4.2 Preparo do mix

O volume da reação utilizada foi de 20 uL, conforme protocolo do Mericon *Listeria monocytogenes* Kit® (Qiagen), sendo 10 uL de Master Mix completo do kit e 10uL de DNA das amostras, assim como DNA dos controles.

Todas as amostras foram analisadas em duas corridas de PCR em tempo real. Em todas as corridas, foi utilizado um tubo de controle positivo para *L. monocytogens* (do kit) e DNA de cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922) como controle negativo, além do controle negativo de reação (do kit).

O gene, os *primers* e a sonda utilizados no kit são segredo comercial, portanto, a empresa não forneceu a informação.

3.3.4.3 Condições da PCR

Toda a programação do equipamento foi realizada conforme as instruções presentes no protocolo do kit, que foram:

Ativação enzima Taq DNA polimerase: 95°C por 5 minutos

Desnaturação: 95°C por 15 segundos

Anelamento: 60°C por 15 segundos

Extensão: 72°C por 10 segundos

3.3.5 Protocolo de PCR em tempo real *in house*

3.3.5.1 Primers e sonda

Para o desenvolvimento do método de PCR em tempo real *in house* for

am utilizados os *primers* e a sonda utilizados por Russo et al (2014), conforme especificado na **Tabela 07**, sendo que os mesmos foram sintetizados pela empresa SIGMA. Esses primers e a sonda foram desenvolvidos a partir de estudos prévios sobre o gene *hly* por Rodriguez et al (2004).

Tabela 07: *Primers* e sonda utilizados no ensaio de PCR em tempo real *in house*

Gene Alvo	Sequencia (5'-3')	Tamanho do Fragmento
	Forward primer	CATGGCACCACCAGCATCT
hly	Reverse primer	ATCCGCGTGTTCCTTTTCGA
	Probe	FAM-CGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCA-TAMRA

Fonte: Adaptado de Russo et al (2014).

3.3.5.1.1 Avaliação especificidade dos *primers* e da sonda para *L. monocytogenes*

- Blast (“Basic Local Alignment Search Tool”) realizada uma análise da especificidade dos *primers* e da sonda, observando a possível ocorrência de amplificação de fragmentos de outras bactérias, principalmente outras espécies de *Listeria*.

- Teste de especificidade: A especificidade dos *primers* e sonda *hly* foi avaliada frente aos DNAs de cepas controle de *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Listeria ivanovii* (ATCC 139), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Vibrio parahaemoliticus* (ATCC 17802), *Vibrio vulnificus* (ATCC 14035), *Vibrio cholerae* (ATCC14035) e *Salmonella thyphimurium* (ATCC 14028). Para a realização deste teste foi preparado o mix de acordo com o descrito no item 3.3.5.2, assim como foram respeitadas as mesmas condições da PCR. Foi utilizado o controle positivo de *L. monocytogenes* (ATCC 19111) e dois tubos de NTC-No Template Control para controle da reação.

3.3.5.2 Preparo do mix

Para a aplicação do protocolo *in house* do PCR em tempo real, foi utilizado o QuantiTect Probe PCR Kit® (Qiagen), o qual acompanha Master Mix e Água livre de Dnase.

Todas as amostras foram analisadas em duas corridas de PCR em tempo real. Em todas as corridas, foi utilizado um tubo de controle positivo para *L. monocytogenes* (do próprio kit) e um DNA de cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922) como controle negativo, além de dois tubos sem nenhuma amostra de DNA (NTC).

O volume da reação utilizada foi de 25uL, conforme protocolo do QuantiTect Probe PCR Kit® (Qiagen), sendo 12,5 uL de Master Mix, 5,5 uL de água livre de Dnease, 2uL de cada *primer* e 1uL da sonda, além de 2 uL do DNA das amostras e controles.

3.3.5.3 Condições de ciclagem

As condições de ciclagem foram escolhidas após a realização de testes, levando em conta as instruções presentes no protocolo do QuantiTect Probe PCR Kit® (Qiagen). Estas foram:

Ativação enzima Taq polimerase: 95°C por 3 minutos

Desnaturação e Anelamento: 95°C por 15 segundos

Extensão: 60°C por 60 segundos

3.3.6 Expressão dos resultados

O resultado foi expresso como: Presença ou Ausência de *L. monocytogenes* em 25 g ou mL.

3.4 Análise estatística dos dados

Para a análise estatística da detecção de *L. monocytogenes* nas amostras, foi calculado o nível de concordância entre os métodos utilizados, através do índice Kappa. Os resultados obtidos foram comparados aos especificados na **Tabela 08**, que define os valores de concordância para o índice.

Tabela 08: Nível de concordância para os valores de Kappa.

Valor de kappa	Concordância
0	Pobre
0 – 0,20	Ligeira
0,21 – 0,40	Considerável
0,41 – 0,60	Moderada
0,61 – 0,80	Substancial
0,81 – 1	Excelente

Fonte: Câmara (2001).

As proporções de amostras positivas detectadas pelos protocolos de PCR em tempo real foram comparados entre si e aqueles obtidos pelo método padrão ISO 11290-1 usando o teste de Qui Quadrado para diferenças significativas χ^2 .

Os valores de Cts obtidos nos dois protocolos de PCR em tempo real foram comparados através do teste T pareado, a fim de averiguar se há diferença significativa entre os valores obtidos.

De acordo com o teste de Qui quadrado e Teste T pareado, considerando um nível de significância definido por $\alpha=0,05$, se $P > 0,05$ não há diferença significativa e se $P < 0,05$ há diferença significativa entre as amostras analisadas, com 95% de grau de confiança.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Detecção de *L. monocytogenes* através da metodologia ISO 11290-1

Foram analisadas, através da metodologia ISO 11290-1, as 90 amostras, sendo que as etapas de enriquecimento seletivo e plaqueamento seletivo foram realizadas para todas as amostras. Após a leitura dos meios de plaqueamento seletivo, 19 amostras apresentaram crescimento de colônias típicas suspeitas de *L. monocytogenes*.

Todas as amostras que apresentaram crescimento de colônias típicas suspeitas de *L. monocytogenes* no plaqueamento seletivo estão listadas na **Tabela 09**, juntamente com o tipo de produto relacionado. As outras amostras avaliadas não tiveram nenhum crescimento de colônia típica em nenhum dos meios utilizados.

Tabela 09: Número de amostras e tipo de produtos que tiveram colônias suspeitas nos meios ALOA e LSA

NÚMERO DA AMOSTRA	PRODUTO
2	PIZZA DE ATUM
8	NUGGETS DE MERLUZA
17	BOLINHO DE BACALHAU
22	BOLINHO DE BACALHAU
24	BOLINHO DE BACALHAU
26	BOLINHO DE BACALHAU
29	FILÉ DE PEIXE EMPANADO
31	FILÉ DE PEIXE EMPANADO
41	FILÉ DE PEIXE EMPANADO
42	MEXILHÕES COZIDOS
45	MEXILHÕES COZIDOS
68	FILÉ DE PEIXE EMPANADO
71	BOLINHO DE PEIXE
74	BOLINHO DE PEIXE
76	BOLINHO DE PEIXE
77	BOLINHO DE PEIXE
80	BOLINHO DE PEIXE
82	HAMBURGUER DE PEIXE
83	HAMBURGUER DE PEIXE

Todas as colônias suspeitas foram isoladas em TSAYE e testadas para confirmação de *L. monocytogenes*, conforme demonstrado na **Tabela 10**. Das 19 amostras que apresentaram alguma colônia suspeita no plaqueamento seletivo, somente seis (31,57%) foram consideradas amostras positivas para *L. monocytogenes* após os testes confirmatórios específicos para o micro-organismo.

Foram testadas, então, 42 colônias suspeitas do meio ALOA e 46 meio LSA, sendo 88 colônias ao todo. Só para a etapa de confirmação, o tempo necessário para obtenção de um resultado definitivo variou de quatro a oito dias. Assim, o tempo total de análise dessas 19 amostras suspeitas ficou entre nove e treze dias.

Tabela 10: Amostras suspeitas, com colônias típicas e análises de confirmação para *L. monocytogenes*

AMOSTRA	CATALASE	GRAM	XILOSE	RAMNOSE	HEMÓLISE	MOTILIDADE	CAMPTESTE	RESULTADO
2	+	+	_/+	-	-	-	-	-
8	+	+	-	+	-	+	+	-
17	+	+	-	+	+	+	+	+
22	+	+	-	+	-	+	+	-
24	+	+	-	+	+	+	+	+
26	+	+	-	+	+	_/+	-	-
29	+	+	+	-	-	+	+	-
31	+	+	-	+	+	+	+	+
41	+	+	-	+	+	+	+	+
42	+	+	-	+	-	+	+	-
45	+	+	+	-	_/+	-	+	-
68	+	+	-	+	+	+	+	+
71	+	+	-	+	+	+	+	+
74	+	+	-	+	-	-	+	-
76	+	+	_/+	-	+	+	-	-
77	+	+	-	+	-	_/+	+	-
80	+	-	-	+	-	-	-	-
82	+	+	-	+	_/+	+	-	-
83	+	+	+	-	+	-	-	-

Em seu estudo, Espíndola (2004) demonstrou que 12% de amostras de peixe congelado tiveram crescimento de colônias suspeitas para *Listeria spp* nos ágar Palcam e Oxford, sendo que o autor confirmou como *L. monocytogenes* em 8% das amostras.

Foram detectadas, assim, pelo método ISO 11290, seis amostras positivas para *L. monocytogenes*, sendo que a porcentagem de positividade em filé de peixe empanado foi de 30%. Já a porcentagem de *L. monocytogenes* em bolinho de bacalhau foi de 20% e de bolinho de peixe foi de 10%.

4.2 Detecção de *L. monocytogenes* através da metodologia de PCR em tempo real

4.2.1 Protocolo de PCR em tempo real através de uso de kit comercial Mericon *Listeria monocytogenes* Kit® (Qiagen)

O teste preliminar realizado do kit Mericon *Listeria monocytogenes* Kit® (Qiagen) para avaliação da eficiência do teste foi satisfatório, tendo o controle positivo e o DNA conhecido de *L. monocytogenes* amplificado com sucesso. O controle negativo e os NTCs não tiveram amplificação. As condições de ciclagem e preparo do mix sugeridos no protocolo do kit foram adequadas e, portanto, mantidas para as análises das amostras.

Das 90 amostras testadas, houve amplificação em sete delas, sendo que o número das amostras, os tipos de produto envolvidos e Cts (*Cycle Threshold*) das curvas amplificadas estão demonstrados na **Tabela 11**.

Tabela 11: Número da amostra, tipo de produto e seus respectivos Cts obtidos na amplificação pelo método de PCR em tempo real por uso de kit comercial

NÚMERO DA AMOSTRA	TIPO DE PRODUTO	CT PCR KIT
3	PIZZA DE ATUM	34,7
17	BOLINHO DE BACALHAU	35,63
20	BOLINHO DE BACALHAU	30,56
24	BOLINHO DE BACALHAU	29,05
41	FILÉ DE PEIXE EMPANADO	31,92
68	FILÉ DE PEIXE EMPANADO	31,21
71	BOLINHO DE PEIXE	30,2

Como pode ser observado, a amostra 17 demonstrou um Ct considerado alto. Isso pode ocorrer devido á inúmeros fatores relacionados a análise e/ou a amostra, como: quantidade e qualidade do DNA utilizado (que pode variar em função da matriz alimentar relacionada, a efetividade do método de extração, entre outros), presença

do patógeno em baixa quantidade, presença de DNA de células mortas, entre outros.

A porcentagem de positividade das amostras testadas pelo método de PCR em tempo real através do uso de kit comercial foi de 30% para bolinho de bacalhau, 20% de filé de peixe empanado, 10% para pizza de atum e bolinho de peixe.

4.2.2 Protocolo de PCR em tempo real *in house*

A avaliação especificidade dos *primers* e sonda para *L. monocytogenes* através do uso do programa Blast demonstrou a ausência de ligações inespecíficas com outros micro-organismos, inclusive outras espécies de *Listeria*.

No teste de especificidade dos *primers* e sonda *hly* frente aos DNAs de cepas controles só houve curva de amplificação do controle positivo para *L. monocytogenes* utilizado. Isso demonstra que os *primers* e a sonda utilizados não se ligam de forma inespecífica aos outros DNAs de micro-organismos testados.

Esse resultado é especialmente importante quando se trata de outras espécies de *Listeria*, as quais podem ser bastante semelhantes geneticamente. Aznar e Alarcon (2002) citam que o fato de várias espécies de *Listeria* serem semelhantes em termos morfológicos, bioquímicos e genéticos faz com que a efetiva prevenção e o controle da listeriose humana dependa da viabilidade, rapidez e da especificidade dos testes para detecção e diferenciação da *L. monocytogenes* das outras espécies de *Listeria*.

Isso ocorre, principalmente, devido as importantes diferenças quanto à patogenicidade da *L. monocytogenes*, *Listeria innocua* e *Listeria ivanovii* em seres humanos. Dessa forma, as ações tomadas pelas autoridades sanitárias responsáveis diferem significativamente conforme a espécie de *Listeria* confirmada pelo teste.

Entre as 90 amostras testadas pelo método de PCR em tempo real *in house*, houve amplificação em oito delas, sendo que os tipos de produto envolvidos e os Cts das curvas amplificadas estão demonstrados na **Tabela 12**.

Como pode ser observado, as amostras 3, 17 e 31 tiveram um Ct considerado alto. Isso pode ocorrer devido á inúmeros fatores relacionados a análise e/ou a amostra, como: quantidade e qualidade do

DNA utilizado (que pode variar em função da matriz alimentar relacionada, a efetividade do método de extração, entre outros), presença do patógeno em baixa quantidade, presença de DNA de células mortas, entre outros.

A percentagem de positividade das amostras testadas pelo método de PCR em tempo real *in house* foram de 30% para bolinho de bacalhau, 30% de filé de peixe empanado, 10% para pizza de atum e bolinho de peixe.

Como já mencionado, a ação da toxina LLO, produzida pelo gene *hly*, é considerada a mais importante entre os fatores de virulência em *L. monocytogenes*. Em função disso, este gene vem sendo amplamente estudado e já tem sido utilizado inclusive para a detecção específica de *L. monocytogenes* em produtos alimentícios (LE MONNIER, 2011).

Tabela 12: Número da amostra, tipo de produto e seus respectivos Cts obtidos na amplificação pelo método de PCR *in house*

NÚMERO DA AMOSTRA	TIPO DE PRODUTO	CT PCR IN HOUSE
3	PIZZA DE ATUM	36,98
17	BOLINHO DE BACALHAU	35,26
20	BOLINHO DE BACALHAU	32,03
24	BOLINHO DE BACALHAU	30,04
31	FILÉ DE PEIXE	35,36
41	FILÉ DE PEIXE	31,17
68	FILÉ DE PEIXE	30,14
71	BOLINHO DE PEIXE	32,01

Vázquez - Boland et al. (2001) citam que diferentes os fatores de virulência agem sinergicamente na sobrevivência intracelular e patogenicidade de *L. monocytogenes*. No trabalho realizado por Das et al. (2013), todas as quatro amostras positivas para *L. monocytogenes* demonstraram a presença de vários genes de virulência, entre eles o gene *hly*, sendo que os autores afirmam que tais genes são responsáveis

por etapas-chave da proliferação celular da bactéria. A presença destes genes de virulência é, portanto, forte indicativo de provável virulência.

Um trabalho realizado por Pushkareva e Ermolaeva (2010), demonstrou que uma estirpe mutante de *L. monocytogenes* deficiente em hemolisina (gene *hly*) foi incapaz de demonstrar sua patogenicidade quando colocado junto a outro micro-organismo, sendo que a estirpe não mutante, ou seja, com hemolisina, foi capaz de prejudicar o crescimento de *Tetrahymena pyriformis*.

4.3 Prevalência de *Listeria monocytogenes* nos produtos testados pelos métodos de PCR em tempo real e ISO 11290-1

Neste estudo, foi observado que, pelo método ISO 11290-1 a incidência de *L. monocytogenes* nos produtos analisados foi de 6,66%, já pelo método de PCR em tempo real através de kit comercial e *in house*, foram, respectivamente, 7,77% e 8,88% para as mesmas amostras.

Após a análise estatística dos resultados, obteve-se um índice Kappa de 0,82 entre os três métodos testados, ou seja, houve uma concordância considerada excelente pelos parâmetros do teste. Entre o método ISO 11290-1 e PCR em tempo real por kit comercial, obteve-se o índice de Kappa de 0,75, ou seja, houve uma concordância considerada substancial pelos parâmetros do teste.

Já entre o método ISO 11290-1 e o PCR em tempo real *in house*, obteve-se o índice de Kappa de 0,84, ou seja, houve uma concordância considerada excelente pelos parâmetros do teste. Já entre os dois protocolos de PCR em tempo real, obteve-se o índice de Kappa de 0,92, ou seja, houve uma concordância considerada excelente pelos parâmetros do teste.

Este resultado está em conformidade com a literatura, uma vez que em peixe fresco ou congelado *Listeria spp* tem sido encontrada, com ocorrência variada (de 2 a 95%) (ESPÍNDOLA, 2004). Em um relato de Embarek e Huss (1994), *Listeria spp.* foi isolada de uma grande variedade de alimentos, incluindo peixes congelados defumados, camarões e peixes fermentados.

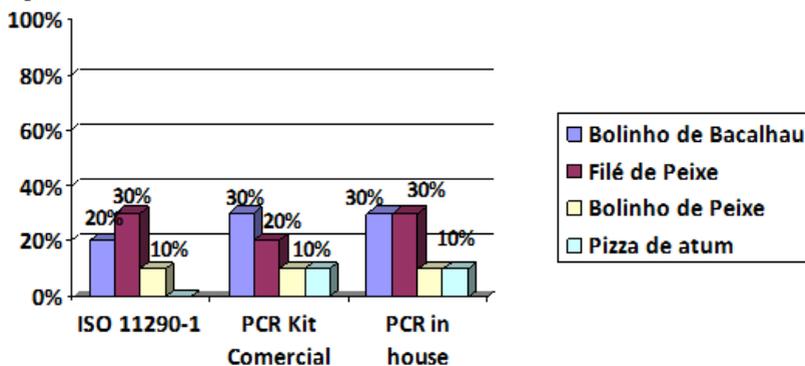
Carpentier e Cerf (2011) afirmam que *L. monocytogenes* é uma causa particularmente importante de doença veiculada por alimento e é encontrada principalmente em alimentos que são embalados e preparados comercialmente, em vez do que as preparadas em casa.

Durante as últimas décadas, o estilo de vida dos consumidores mudou, em função do menor tempo disponível para a preparação de alimentos, o consumo de alimentos prontos para o consumo (RTE) aumentou de forma significativa (SCHMID et al., 2014).

O presente estudo analisou justamente a incidência de *L. monocytogenes* em produtos que não sofrerão processos térmicos ou somente serão submetidos a processos térmicos brandos. A literatura é bastante escassa quanto à incidência desses patógenos em alimentos desse tipo, principalmente a base de pescado.

Os produtos que demonstraram a maior incidência de *L. monocytogenes* nos métodos testados, foram bolinho de bacalhau, filé de peixe, bolinho de peixe e pizza de atum, conforme demonstrado na **Figura 04**. Estes produtos a base de pescado normalmente sofrem processos térmicos brandos antes do consumo, sendo que muitas vezes, o centro do alimento não atinge uma temperatura suficiente para garantir a completa eliminação de *L. monocytogenes*.

Figura 04: Comparação da incidência de *L. monocytogenes* por tipo de produto nos métodos ISO 11290-1, PCR em tempo real por kit comercial e PCR em tempo real *in house*



Alguns trabalhos demonstraram outros índices de incidência de *L. monocytogenes*, como 3,3% em amostras de frutos do mar prontos para o consumo no Japão e 54% de pescados frescos comprados nos mercados de varejo nos EUA (DRAUGHON et al., 1999; INOUE et al., 2000; NEETTO et al., 2008).

Gonzales et al. (2013) relatou que foram analisadas 250 amostras de produtos de pescado, durante um ano, utilizando as

metodologias padrão - ISO 11290-1/ A1 e ISO 11290-2. Uma baixa prevalência de *L. monocytogenes* foi observada nos produtos de surimi, enquanto que 4,8% das amostras de salmão fumado foram positivas para *Listeria* com níveis baixos (< 10 UFC/g) e distribuição desigual do patógeno. Uma única empresa foi responsável por 80% dos lotes positivos.

Destro et al. (1994) relatou a ocorrência de *L. monocytogenes* em camarões processados em indústrias brasileiras. De 178 amostras analisadas, 89 (50,0%) foram positivas para *Listeria sp.*, sendo que, *L. monocytogenes* foi detectada em 32 amostras (18,0%); *L. innocua* em 30 amostras (16,9%); *L. seeligeri* em 40 (22,4%); *L. ivanovii* em 11(6,2%); e *L. welshimeri* em 3% das amostras (1,7%).

Em um trabalho publicado por Uyttendaele (2009), foi demonstrado que peixe defumado pode ser considerado um produto de alto risco de contaminação por *L. monocytogenes*, com ocorrência deste patógeno em 28,8% das amostras analisadas e com populações acima de 100 UFC/ml. Também um estudo realizado na cidade de Ribeirão Preto demonstrou a presença de *Listeria spp.* e de *L. monocytogenes* em surubim defumado a frio e embalado a vácuo (ALVES, 2005).

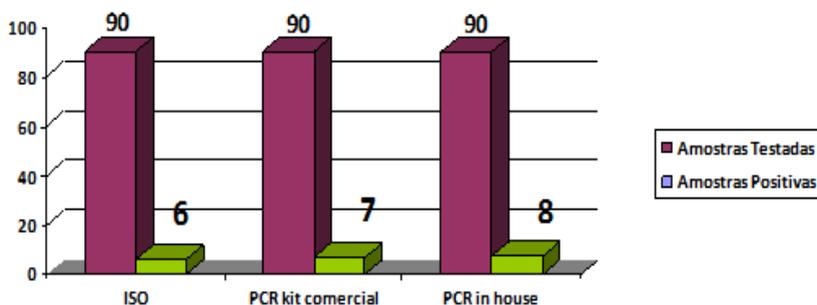
Os altos índices de incidência de *L. monocytogenes* em produtos processados tem estreita relação com a capacidade desse patógeno de formar biofilmes e resistir a baixas temperaturas dentro da indústria. A contaminação cruzada de produtos pós processamento é um risco constante dentro da realidade de produção de alimentos, inclusive produtos a base de pescado. Trachoo (2003) afirma que a capacidade de formar biofilmes em fábricas de processamento de alimentos torna *L. monocytogenes* uma bactéria com grande potencial de contaminação.

Além de aumentar os riscos de toxinfecções alimentares, os biofilmes comprometem a sanitização de superfícies em contato com os alimentos e ocasionam prejuízos financeiros à indústria, em virtude da diminuição da vida de prateleira dos produtos alimentícios, danos a equipamentos e diminuição da eficiência das operações dentro da indústria (Di BONAVENTURA et al., 2008; FLASH et al., 2005; JESSEN; LAMMERT, 2003; KUMAR; MAUKONEM et al., 2003; SHARMA; ANAND, 2002; TRACHOO, 2003).

4.4 Comparação entre os Protocolos de PCR em tempo real e a metodologia ISO 11290-1

A **Figura 05** demonstra a relação entre as amostras testadas e amostras positivas nos três métodos. Após a análise estatística dos resultados, obteve-se, pelo método Qui Quadrado, um valor de $P= 0,97$ entre os três métodos. Isso significa que, em um nível de confiança de 95%, onde $P>0,05$, não há diferença estatística significativa entre os métodos testados.

Figura 05: Amostras positivas para *L. monocytogenes* nos métodos ISO 11290-1, PCR em tempo real por kit comercial e PCR em tempo real *in house*



Da mesma forma, obteve-se um valor de $P= 0,72$ entre o método ISO 11290-1 e o protocolo de PCR em tempo real por kit comercial. Isso significa que, em um nível de confiança de 95%, onde $P>0,05$, não há diferença estatística significativa entre os métodos testados.

Entre o método ISO 11290-1 e o protocolo de PCR em tempo real *in house*, obteve-se um valor de $P= 0,81$ e Isso significa que, em um nível de confiança de 95%, onde $P>0,05$, não há diferença estatística significativa entre os métodos testados. Já entre os protocolos de PCR em tempo real *in house* e por kit comercial, obteve-se um valor de $P= 0,84$ e Isso significa que, em um nível de confiança de 95%, onde $P>0,05$, não há diferença estatística significativa entre os métodos testados.

O fator tempo no caso da detecção de *L. monocytogenes* em alimentos tem sido um enorme problema, principalmente em função do interesse de liberação de lotes de produtos com vida útil limitada pela indústria. Além disso, é de interesse dos consumidores e da próprio órgão fiscalizador que os testes de detecção do patógeno sejam o mais

eficiente possível, a fim de garantir a inocuidade dos produtos a serem consumidos.

Inúmeros estudos têm demonstrado as vantagens do uso do PCR em tempo real na detecção de patógenos em alimentos em relação aos métodos convencionais. Jofre et al. (2005) cita que a detecção de agentes patogênicos em alimentos envolvem várias etapas de enriquecimento, placa de isolamento e identificação bioquímica, levando até 10 dias no caso de *L. monocytogenes*.

Hyeon et al. (2010) e Kobayashi et al. (2009) afirmam que técnicas baseadas em PCR tem o potencial para permitir uma rápida e sensível detecção de agentes patogênicos de origem alimentar. Uma vez que a PCR pode detectar seqüências genéticas únicas, tais como genes de virulência de micro-organismos, isto tem também a vantagem de ser um ensaio específico.

Rossmann et al. (2006) demonstrou em seu estudo, com 76 amostras de alimentos contaminados naturalmente de diversos tipos, que, comparando os resultados de PCR em tempo real com o método padrão ISO 11290-1, a precisão relativa foi de 96%, a especificidade relativa de 100%, e a sensibilidade relativa, 76,9%.

Gatuso et al. (2014) obteve resultados, por PCR em tempo real, detectando até cerca de 8 UFC de *L. monocytogenes* por amostra em menos de 27 horas. O autor comparou esse método a ISO 11290-01 e concluiu que o PCR em tempo real proporcionou resultados mais rapidamente (27 horas versus sete dias) e de forma mais econômica (cinco vezes mais barato). Isso representa uma vantagem óbvia a fim de reduzir o custo e o tempo de análise em comparação com o método de análise de referência (GATUSO et al., 2014).

Alarcon et al. (2004) discute ainda que os patógenos bacterianos podem ocorrer em níveis baixos, por isso sua detecção é geralmente precedida por uma etapa de enriquecimento para aumentar o número de célula para o nível de detecção. Hyeon et al. (2010) e Kobayashi et al. (2009) afirmam que mesmo estes métodos rápidos de detecção, no entanto, ainda exigem um processo de enriquecimento.

Navas et al. (2006) reforça que o enriquecimento é necessário para se obter um maior número de resultados positivos por PCR com *L. monocytogenes*. Estudos anteriores já haviam utilizado com sucesso o caldo utilizado neste trabalho (Half- Fraser) para o enriquecimento seletivo de *L. monocytogenes* (BADOSA et al., 2009; CHUA; BHAGWAT, 2009; JOFRE et al., 2005; RUIZ - RUEDA et al., 2010).

Muitos outros autores têm demonstrado ainda as vantagens da utilização métodos de PCR em tempo real (ELIZAQUIVEL; AZNAR,

2008; RUIZ-RUEDA et al., 2010; SINGH et al., 2011). Kacliková et al. (2003) avaliou um protocolo de PCR em tempo real em amostras naturalmente contaminadas (140 amostras), sendo que os resultados obtidos foram idênticos aos obtidos pelo método padrão ISO 11290-1, em um tempo bem menor e sem análises subjetivas.

Amar (2012) afirma que o método de PCR em tempo real é rápido, altamente específico e reprodutível, e isso é uma vantagem através de PCR com base em gel ou métodos de identificação bioquímica. O ensaio em tempo real desenvolvido neste estudo permitiu a identificação de espécies de *Listeria* partir de culturas dentro de 2 horas.

Cruz et al. (2012) demonstrou, em seu estudo, que os cinco kits rápidos testados produziram resultados com sensibilidade semelhante aos métodos convencionais, quando aplicado a amostras de marisco inoculadas com baixas e altas concentrações de *L. monocytogenes*. Estudos anteriores têm enfatizado os benefícios da utilização destes métodos de rastreio rápido para a detecção de *Listeria* em amostras de alimentos (ARAGON - ALEGRO et al , 2005; . OKTAY E HEPERKAN , 2006; REITER et al., 2010).

Em contraste com os testes de diagnóstico convencionais, os testes de PCR não consomem apenas menos tempo, mas eles também são menos influenciados por fatores externos que alteram o crescimento e o metabolismo das bactérias. Com tudo, o resultado positivo na PCR não certifica a presença de *Listeria* sp. viável na amostra (ESPÍNDOLA 2004).

Entretanto, a confirmação de positividade das amostras por pelo menos dois métodos pressupõe não se tratar de células de *L. monocytogenes* não viáveis. Dentre todas as amostras positivas, somente a amostra de número 31, um filé de peixe, a qual não foi confirmada na metodologia ISO 11290-1 pode ter sua viabilidade questionada.

4.4.1 Comparação dos valores de Cts entre os protocolos de PCR em tempo real

Após a análise estatística aplicada nos valores de Cts obtidos nas curvas de amplificação do método de PCR em tempo real pelos protocolos *in house* e uso do kit comercial obteve-se um valor de $P=0,13$, ou seja, $P>0,05$. Isso significa que, para um nível de confiança de 95%, não houve diferença significativa entre os valores de Cts analisados.

Isso demonstra que independente do protocolo utilizado na aplicação da técnica de PCR em tempo real, foi possível obter um resultado de detecção de *L. monocytogenes* confiável e reprodutível. A maior diferença entre os dois protocolos reside no custo benefício, já que os kits comerciais de PCR tendem a encarecer bastante as análises. Além disso, não é possível conhecer qual o gene de interesse amplificado, no caso do kit comercial em função da impossibilidade da obtenção da informação.

CONCLUSÕES

Os índices de incidência demonstrados no trabalho nos permitem concluir que os consumidores podem ser expostos a esse patógeno no momento do consumo, quando o preparo desses produtos pré prontos para o consumo for inadequado. Sendo que gestantes, idosos, neonatos e indivíduos imunodeprimidos podem sofrer conseqüências graves.

Conclui-se, assim, que se faz necessária a adoção de práticas mais eficientes de controle na produção de produtos de pescado, a fim de evitar a exposição dos consumidores ao risco. A contaminação cruzada pós processamento deve ser alvo de atenção dentro da rotina industrial, com adoção de medidas que reduzam a formação de biofilmes e, conseqüentemente a sobrevivência e manutenção deste micro-organismo no ambiente industrial.

Com relação á comparação entre os métodos testados, é possível concluir que se faz necessário um estudo de avaliação de sensibilidade, reprodutibilidade e repetibilidade do método de PCR em tempo real *in house*, a fim de validar este protocolo. Os protocolos do método de PCR em tempo real demonstraram-se estatisticamente semelhante ao método padrão ISO 112900-1 quanto á capacidade de detecção, no entanto, os mesmos foram capazes de detectar as amostras positivas para *L. monocytogenes* de forma menos subjetiva, em mais rápida.

Conclui-se ainda que são necessários trabalhos voltados ao desenvolvimento e validação de protocolos de PCR em tempo real para a quantificação de células viáveis de *L. monocytogenes* neste tipo de alimento. Além disso, um estudo genético das cepas de *L. monocytogenes* encontradas é sugerido, a fim de conhecer melhor a virulência dos mesmos e contribuir com a literatura mundial sobre o assunto.

6 REFERÊNCIAS

ALARCON, B.; GARCIA-CANAS, V.; CIFUENTES, A.; GONZALEZ, R.; AZNAR, R. (2004). Simultaneous and sensitive detection of three foodborne pathogens by multiplex PCR, capillary gel electrophoresis, and laser-induced fluorescence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 7180 e 7186.

ALVES, V. F. Ocorrência e controle de *Listeria monocytogenes* em pescado minimamente processado. 2005. 104f. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

AMAR, C. (2012) Molecular diagnosis of gastrointestinal pathogens. In *Molecular Diagnostics of Infectious Diseases*, 2nd edn. ed. Harald, H., pp 145 163.

AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 2- Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria. *Food Control*, v. 17, p. 462-468, 2006.

ARAGON-ALEGRO, L.C.; WITTMANN, R.M.; PADOVANI, C.R.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.; DESTRO, M.T.; 2005. Detection of *Listeria* sp in meat and meat products using TECRA *Listeria* visual immunoassay and biocontrol visual immunoprecipitate assay for *Listeria* immunoassays and a cultural procedure. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 13, 204–212.

AZNAR, R.; ALARCON, B. On the specificity of PCR detection of *L. monocytogenes* in food: a comparison of published *primers*. *System Applied Microbiology*, n. 25. p .109-119.2002.

BADOSA, E.; CHICO, N.; PLA, M.; PARES, D.; MONTESINOS, E. (2009). Evaluation of ISO enrichment real-time PCR methods with internal amplification control for detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in fresh fruit and vegetables. *Letters in Applied Microbiology*, 49(1), 105 e 111.

BARBALHO, T.C.F.; ALMEIDA, P.F.; ALMEIDA, R.C.C.; HOFER, E. Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid confirmation of suspect colonies. Food Control, v. 16, p. 211-216, 2005.

BENETTI, T.M.; MONTEIRO, C.L.B.; BEUX, M.R.; ABRAHÃO, W.M. Comparison of selective agars recommended by method ISO 11290-1 and chromogenic agars for the isolation of *Listeria* sp. in refrigerated sausages. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 48, n. 4, oct./dec., 2012.

BREMER P.; FLETCHER, G.; OSBORNE, C. *Listeria monocytogenes* in seafood. New Zealand Institute for Crop and Food Research. Auckland, New Zealand. p 1–13. 2003.

BURLINGAME, B.; PINEIRO, M.; The essential balance: risks and benefits in food safety and quality. Journal of Food Composition and Analysis, v. 20, p. 139-146, 2007.

CÂMARA, F. G. (2001) “Estatística Não Paramétrica: Testes de hipóteses e medidas de associação” *Monografias da SEIO*. Depto. Matemática da Univ. dos Açores: Ponta Delgada, www.uac.pt/~amendes (ID 1.431)

CARPENTIER, B.; CERF, O. Resistance of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. Int J Food Microbiol 2011; 145: 1–8.

CHUA, T.; BHAGWAT, A. A. (2009). A rapid and simple DNA extraction procedure to detect *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* from fresh produce using real-time PCR. Food Analytical Methods, 2(2), 96e101.

CRUZ, C.; Win, J. K.; Chantarachoti, J.; Mutukumira, A.; Fletcher, G. C.; Comparing rapid methods for detecting *Listeria* in seafood and environmental samples using the most probably number (MPN) technique. International Journal of Food Microbiology 153 (2012) 483–487

DAS, S.; KUTTANAPPILLY, V. L.; THAMPURAN, N.; POOTHAVALLIL, K. S.; Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from tropical seafood of Kerala, India. *Ann Microbiol* (2013) 63:1093–1098

DESTRO, M. T.; PIVA, F. C.; LEITÃO, M. F. F.; LANDGRAF, M.; 1994. Occurrence of *Listeria* sp. in shrimp from Brazilian processing plant. IN: 3rd INTERNATIONAL ASEPT CONFERENCE, FOOD SAFETY 94. 1994. p.330

DI BONAVENTURA, G.; PICCOLOMINI, R.; PALUDI, D.; D'ORIO, V.; VERGARA, A.; CONTER, M.; IANIERI, A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, v.104, p. 1552–1561, 2008.

DOGANAY, M. Listeriosis: clinical presentation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 35, p. 173-175, 2003.

DRAUGHON, F.A.; ANTHONY, B. A.; DENTON, M.E.; *Listeria* species in fresh rainbow trout purchased from retail markets. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* v. 19, p. 90-94, 1999.

ELIZQUIVEL, P.; AZNAR, R. (2008). A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables. *Food Microbiology*, 25(5), 705 e 713.

EMBAREK, P. K.; HUSS, H. H. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 23 p. 17-34. 1994.

ESPÍNDOLA; Ocorrência de *listeria* spp, em amostras de pescado e ambiente de indústria de processamento e comercialização de pescado do litoral de santa Catarina. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, Santa Catarina, 2004.

FLASH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com o leite: fatores de virulência envolvidos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, p. 291-296, 2005.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L.; *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. Journal. Food Microbiology*, v.113, p.1-15, 2007.

GATUSO, A.; GIANFRANCESCHI, M. V.; SONNESSA, M.; DELIBATO, E.; MARCHESAN, M.; HERNANDEZ, M.; DE MEDICI, D.; RODRIGUEZ-LAZARO, D.; Optimization of a Real Time PCR based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in pork meat. *International Journal of Food Microbiology* 184 (2014) 106–108.

GONZALEZ, D.; VITAS, A.I.; DÍEZ-LETURIA, M.; GARCÍA-JALÓN, I.; *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood in Spain: Study of prevalence and temperatures at retail. Food Microbiology, v.36, Issue 2, December 2013, Pages 374–378

GHANBARI, J. M.; DOMIG, K. J.; KNEIFEL, W.; Seafood biopreservation by lactic acid bacteria – a review. *LWT – Food Sci Technol* 50(2):315–24. 2013.

HARVEY, J.; KEENAM, K.P.; GILMOUR, A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*, v. 24, p. 380-392, 2007.

HYEON, J. Y.; HWANG, I. G.; KWAK, H. S.; PARK, C.; CHOI, I. S.; SEO, K. H.; (2010). Evaluation of PCR inhibitory effect of enrichment broths and comparison of DNA extraction methods for detection of *Salmonella Enteritidis* using real-time PCR assay. *Journal of Veterinary Science*, 11(2), 143e149.

INOUE, S.; NAKAMA, A.; ARAI, Y.; KOKUBO, Y.; MARUYAMA, T.; SAITO, A., YOSHIDA, T.; TERAOKA, M.; YAMAMOTO, S., KUMAGAI, S. Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan. *International Journal of Food Microbiology* v. 59, p. 73-77. 2000.

ISO 11290-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* — Part 1: Detection method. 1996.

JESSEN, B.; LAMMERT, L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 51, p. 265-269, 2003.

JEYALETCHUMI, P., TUNUNG, R., MARGARET, S. P., SON, R., GHAZALI, F. M., CHEAH, Y. K., NISHIBUCHI, M., NAKAGUCHI, Y. E MALAKAR, P. K. Quantification of *Listeria monocytogenes* in salad vegetables by MPN-PCR. *International Food Research Journal* 17: 281-286 (2010).

JOFRE, A.; MARTIN, B.; GARRIGA, M.; HUGAS, M.; PLA, M.; RODRIGUEZ-LAZARO, D.; (2005). Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. *Food Microbiology*, 22(1), 109 e115.

KACLÍKOVÁ, E.; PANGALLO, D.; DRAHOVSKÁ, H.; ORAVCOVÁ, K.; KUČHTA, T.; Detection of *Listeria monocytogenes* in food, equivalent to EN ISO 11290-1 or ISO 10560, by a three-days polymerase chain reaction-based method. *Food Control*. Volume 14, Issue 3, April 2003, Pages 175–179.

KLETER, G. A.; MARVIN, H. J. P. Indicators of emerging hazards and risks to food safety. *Food and Chemical Toxicology*, doi:10.1016/j.fct.2008.07.028, 2008.

KOBAYASHI, H.; KUBOTA, J.; FUJIHARA, K.; HONJOH, K.; ITO, M.; FUJIKI, N.; (2009). Simultaneous enrichment of *Salmonella* spp, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, and *Listeria monocytogenes* by single broth and screening of the pathogens by multiplex real-time PCR. *Food Science and Technology Research*, 15(4), 427 e 438.

KUMAR; C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 42, p.9-27, 1998.

LE MONNIER, A. Diagnosis of *Listeria monocytogenes* Meningoencephalitis by Real- Time PCR for the *hly* Gene. Journal of Clinical Microbiology, Washington, D. C., v. 49, n. 11, p. 3917- 3923, novembro 2011.

MAUKONEM, J.; MÄTTÖ, J.; WIRTANEM, G; RAASKA, L.; MATTILA SANDHOLM, T.; SAARELA, M. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 30, p. 327-356, 2003.

MCLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R.T.; SMERDON, W.J.; JEWELL, K.; *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. Int. J. Food Microbiol., 92: 15-33, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - MS, 2005. Guia alimentar para a população brasileira, promovendo a alimentação saudável, Brasília – DF; 2005. Disponível em:<<http://www.opas.org.br/familia/temasdocumentosdetalhe.cfm?id=60&iddoc=166>>. Acesso em 14 nov 2014.

NAVAS, J.; ORTIZ, S.; LOPEZ, P.; JANTZEN, M. M.; LOPEZ, V.; MARTINEZ-SUAREZ, J. V. (2006). Evaluation of effects of primary and secondary enrichment for the detection of *Listeria monocytogenes* by real-time PCR in retail ground chicken meat. Foodborne Pathogens and Disease, 3(4), 347 e 354.

NEETOO, H.; MU, YE; HAIQIANG, CHEN; ROLF, D. Use of nisin-coated plastic films to control *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged cold-smoked salmon. International Journal of Food Microbiology, v.122, p. 8–15, 2008.

NORHANA, M. N. W; POOLE, S. E.; DEETH, H. C.; DYKES, G. A. Prevalence, persistence and control of salmonella and *Listeria* in shrimp and shrimp products: a review. Food Control (2010). 21:343–61.

OKTAY, H.I.; HEPERKAN, D.; 2006. Evaluation of ISO methods and Vidas automated system for identifying *Listeria* and *Salmonella* in selected foods. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 14, 133–145.

PAGADALA,S; PARVEEN, S.,RIPPEN, T., LUCHANSKY, J. B., CALL J. E., TAMPLIN, M. L., PORTO-FETT A. C.S., Prevalence, characterization and sources of *Listeria monocytogenes* in blue crab (*Callinectes sapidus*) meat and blue crab processing plants Food Microbiology 31 (2012) 263 e 270

PAGADALA,S;; PARVEEN, S.; RIPPEN, T.; LUCHANSKY, J. B.; SCHWARZ, J.G.; Comparison of Automated BAX PCR and Standard Culture Methods for Detection of *Listeria monocytogenes* in Blue Crabmeat (*Callinectes sapidus*) and Blue Crab Processing Plants. Journal of Food Protection, Vol. 74, No. 11, Pages 1930–1933 doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-213. 2011.

PUSHKAREVA, V.; ERMOLAEVA, S.A.; *Listeria monocytogenes* virulence factor Listeriolysin O favors bacterial growth in co-culture with the ciliate *Tetrahymena pyriformis*, causes protozoan encystment and promotes bacterial survival inside cysts. BMC Microbiology 2010, 10:26

RANTSIOU, K.; ALESSANDRIA,V.; URSO, R.; DOLCI,P.; COCOLIN, L.; Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. International Journal of Food Microbiology 121 (2008) 99–105.

REIJ, M; W.; DEN, A.; ANTREKKER, E.D.; Recontamination as a source of pathogens in processed foods. Intl J Food Microbiol 91:1–11. 2004

REITER, M. G.; L PEZ, G.; JORDANO, R., 2010. Comparative study of alternative methods for food safety control in poultry slaughterhouses. Food Analytical Methods 3 (3), 253–260.

ROCOURT, J.; BENEMBAREK, P.; TOYOFUKU, H.; SCHLUNDT, J.; Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. Fems Immunol Med Microbiol 35:263–7. 2003.

ROSSMANITH, P.; KRASSNIG, M.; WAGNER, M.; HEIN, I.; Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined

enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene. Research in Microbiology. Volume 157, Issue 8, October 2006, Pages 763–771.

RUIZ-RUEDA, O.; SOLER, M.; CALVO, L. (2010). Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in food samples. Food Analytical Methods.

RUSSO, P.; BOTTICELLA, G.; CAPOZZI, V.; MASSA, S.; SPANO, G. E BENEDUCE, L.; A Fast, Reliable, and Sensitive Method for Detection and Quantification of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Ready-to-Eat Fresh-Cut Products by MPN-qPCR. BioMed Research International, Volume 2014, Article ID 608296, 9 pages

SCOTTER, S. L.; Langton,S; Lombard, B.; Schulten, S.; Nagelkerke, N.; In't Veld, H. P.; Rollier, P.; Lahellec, C.; Validation of ISO method 11290 Part 1-Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. International Journal of Food Microbiology. Volume 64, Issue 3, 20 March 2001, Pages 295–306.

SCHMID, G.; ALLERBERGER, F.; HUHULESCU, S.; PIETZKA, A.; AMAR, C.; KLETA, S.; PRAGER, R.; PREUßE, K.; AICHINGER, E.; MELLMANN, A.; Whole genome sequencing as a tool to investigate a cluster of seven cases of listeriosis in Austria and Germany, 2011–2013. Clin Microbiol Infect 2014; 20: 431–436. 2014.

SERGELIDIS, D.; ABRAHIM, A. Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. **Food Control** v. 20, p. 1-10, 2009.

SINGH, J.; BATISH, V. K.; GROVER, S. (2011). Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in dairy products using real time PCR-melt curve analysis. Journal of Food Science and Technology,

SHARMA, M.; ANAND, S.K., Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. Food Control, v. 13, p. 469-477, 2002.

SWAMINATHAN, B.; CABANES, D.; ZHANG, W.; COSSART, P.; *Listeria monocytogenes*. In: Doyle MP, Beuchat LR, eds. Food microbiology: fundamentals and frontiers, 3rd edn. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2007; 457–491.

TRACHOO, N. Biofilm and the food industry. *Journal of Science Technology* v. 25, p. 807-815, 2003.

USHA, M. R., TUNUNG, R., CHAI, L. C., GHAZALI, F. M., CHEAH, Y. K., NISHIBUCHI, M.; SON, R. A study on *Campylobacter jejuni* cross-contamination during chilled broiler preparation. *International Food Research Journal* 17: 107-115 (2010).

UYTTENDAELE, M. Prevalence and challenge tests of *Listeria monocytogenes* in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. *International Journal of Food Microbiology*, v. 133, p. 94-104, 2009.

VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ- BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J.; (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 14:584–640

WHO. World Health Organization (Disponível em: <
http://www.who.int/foodsafety/fs_management/haccp/en/index.html>
Acesso em: 25/10/2008