



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA E DIFERENCIAÇÃO DE  
ESPÉCIES DE *LISTERIA* SPP. POR ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DE  
FRAGMENTOS DE PCR (RFLP-PCR) EM AMOSTRAS DE  
CARNES E DERIVADOS COMERCIALIZADOS NO DISTRITO  
FEDERAL**

**RAFAEL ROCHA DE ANDRADE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA / DF  
NOVEMBRO / 2008**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA E DIFERENCIAÇÃO DE  
ESPÉCIES DE *LISTERIA* SPP. POR ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DE  
FRAGMENTOS DE PCR (RFLP-PCR) EM AMOSTRAS DE  
CARNES E DERIVADOS COMERCIALIZADOS NO DISTRITO  
FEDERAL**

**RAFAEL ROCHA DE ANDRADE**

**ORIENTADOR(A): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
EM SAÚDE ANIMAL**

**PUBLICAÇÃO:002/2008**

**BRASÍLIA / DF  
NOVEMBRO / 2008**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

ANDRADE, R. R. **Identificação microbiológica e diferenciação de espécies de *Listeria* spp. por análise de restrição de fragmentos de PCR (RFLP-PCR) em amostras de carnes e derivados comercializados no Distrito Federal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 61p. Dissertação de Mestrado.

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

### FICHA CATALOGRÁFICA

Andrade, Rafael Rocha de

Identificação Microbiológica e Diferenciação de Espécies de *Listeria* spp. por Análise de Restrição De Fragmentos de PCR (RFLP-PCR) em Amostras de Carnes e Derivados Comercializados no Distrito Federal. / Rafael Rocha de Andrade; orientação de Ângela Patrícia Santana, 2008.61p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

1. Diagnóstico Molecular. 2. *Listeria monocytogenes*. 3. RFLP-PCR
4. Identificação de espécies de *Listeria* spp. I. Santana, A.P. II. Identificação Microbiológica e Diferenciação de Espécies de *Listeria* spp. por Análise de Restrição De Fragmentos de PCR (RFLP-PCR) em Amostras de Carnes e Derivados Comercializados no Distrito Federal.

CDD ou CDU  
Agris / FAO

À minha esposa, meus filhos,  
Lucas e Diogo, a Deus e à  
minha família

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, que a cada dia me concedeu saúde, força e paz para avançar nos desafios da vida.

Aos meus dois filhos: Lucas e Diogo (este último ainda na barriga da mamãe) por recarregarem a minha bateria com doses diárias de muita alegria.

À minha querida companheira, Eloá Medeiros, mãe dos meus filhos, e, simplesmente, uma pessoa que se supera a cada dia no quesito mulher, conferindo-lhe o título de mãe e esposa perfeita.

À minha mãe, Miriam Rocha, ao meu pai, Gabriel Santos de Andrade, meu irmão, Gustavo Rocha de Andrade, e minha irmã, Patrícia de Andrade Bentes. Pessoas que são responsáveis pelo que sou hoje.

Aos meus amigos sempre presentes em todas as horas: Matheus Geraldo, Gabriel Henrique, Marcelo Miller, Felipe Bueno, Jose Waldo, Alan Silva, Franklin Martins, Pablo Prazeres e Mateus Alcântara.

À minha professora e orientadora Ângela Patrícia Santana, por acreditar em meu potencial e se dedicar em prol de minha elevação profissional.

À colega de profissão e de pós-graduação Camila Guimarães, pelos momentos de companhia e ajuda no entedimento da ciência.

Às pessoas do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos e Microbiologia clínica, fundamentais para a evolução desse estudo: Nara, Hudson e Vinícius.

À minha companheira de bancada durante toda pesquisa, Fernanda, que me ajudou a compreender melhor o mundo invisível da Biologia Molecular.

Aos professores da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, em especial à Profa. Giane Regina Paludo, Prof. Márcio, Prof. Richard Filgueiras, Prof. Francisco Ernesto Bernal e Prof. Vítor Salvador Gonçalves por todo apoio a este trabalho.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Biologia da UnB, em especial: Fátima, Ivonildes, Viviane, Fernando Araripe.

**OBRIGADO!**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
<b>1.Introdução.....</b>	<b>10</b>
<b>2.Justificativa .....</b>	<b>13</b>
<b>3.Objetivos .....</b>	<b>15</b>
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos Específicos.....	15
<b>4. Revisão de Literatura.....</b>	<b>16</b>
4.1 Agente Etiológico.....	16
4.2 Sistematização.....	17
4.3 Características Bioquímicas.....	17
4.4 Histórico da Listeriose.....	18
4.5 Habitat.....	18
4.6 Patogenia da Listeriose em Humanos.....	19
4.7 Sinais Clínicos da Listeriose em Humanos.....	20
4.8 Listeriose nos Animais.....	21
4.9 Importância da <i>Listeria monocytogenes</i> nos Alimentos.....	22
<b>5. Materiais e Métodos.....</b>	<b>24</b>
5.1. Origem das Amostras.....	24
5.2 Isolamento Microbiológico da <i>Listeria</i> spp.....	24
5.3. Teste Bioquímico Complementar pelo Kit API-Listeria.....	26
5.4. Diagnóstico Molecular: PCR e Análise de Restrição para Diferenciação das Espécies de <i>Listeria</i> spp.....	26
5.4.1 Origem do Controle Positivo.....	26
5.4.2 Extração e Quantificação de DNA do Controle Positivo.....	26
5.4.3 Realização da PCR e Quantificação de DNA ( <i>Amplicon</i> ) para o Controle Positivo.....	27
5.4.4 Realização da RFLP-PCR para o Controle Positivo.....	29
5.5. Extração de DNA das Cepas de <i>Listeria</i> spp. Isoladas de Salsichas tipo Hot Dog a Granel e Carne Bovina Homogeneizada a Granel.....	31
5.5.1 Realização da PCR das Cepas de <i>Listeria</i> spp. Isoladas de	

Salsichas Tipo Hot Dog a Granel e Carne Bovina Homogeneizada a Granel.....	31
5.5.2 Realização da RFLP-PCR das Cepas de <i>Listeria</i> spp. Isoladas de Salsichas Tipo Hot Dog e Carne Bovina Homogeneizada.....	32
5.6. Análise Estatística da Ocorrência de Cepas De <i>Listeria</i> spp. nas Amostras de Salsichas Tipo Hot Dog e Carne Bovina Homogeneizada.....	32
<b>6. Resultados e Discussão.....</b>	<b>33</b>
6.1 Ocorrência de Cepas de <i>Listeria</i> spp. em Amostras de Salsichas Tipo Hot Dog a Granel.....	33
6.2 Ocorrência de Cepas de <i>Listeria</i> spp. em Amostras de Carne Bovina Homogeneizada a Granel.....	35
6.2.1 Análise Estatística.....	36
6.3 Extração e Quantificação de DNA do Controle Positivo.....	40
6.4 PCR e Quantificação de <i>Amplicon</i> do Controle Positivo ( <i>Listeria monocytogenes</i> ) .....	41
6.5 RFLP do Controle Positivo.....	42
6.6 Extração e Quantificação de DNA Total de Cepas de <i>Listeria</i> spp. Isoladas de Salsichas Tipo Hot Dog a Granel e de Carne Bovina Homogeneizada a Granel.....	44
6.7 Realização da PCR das Cepas de <i>Listeria</i> spp. Isoladas de Salsichas Tipo Hot Dog e Carne Bovina Homogeneizada.....	46
6.8 Realização da RFLP-PCR das Cepas de <i>Listeria</i> spp. Isoladas de Salsichas Tipo Hot Dog e Carne Bovina Homogeneizada.....	47
<b>7. Conclusão.....</b>	<b>53</b>
<b>8. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>54</b>

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência e identificar, por análise bioquímica e RFLP-PCR do gene 23S rRNA, as espécies de *Listeria* spp. presentes em amostras de salsichas tipo hot dog a granel e carne bovina homogeneizada a granel comercializadas no Distrito Federal. A metodologia usada para a realização do isolamento bacteriano, bem como a diferenciação bioquímica foi a preconizada pela Instrução Normativa n° 40, de 16 de dezembro de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA), e, para a RFLP-PCR foi utilizada a metodologia descrita por Paillard *et al.*, (2003). Um total de 162 amostras, sendo 127 salsichas tipo hot dog e 35 amostras de carne bovina homogeneizada foram testadas. Das 127 amostras de salsichas tipo hot dog analisadas, 26 foram positivas para *Listeria* spp.. e, destas amostras positivas, 18 foram identificadas como *Listeria innocua* e 09 como *Listeria monocytogenes*, tanto na identificação por testes bioquímicos como por RFLP-PCR. Das 35 amostras de carne bovina homogeneizada testadas, 16 foram positivas para *Listeria* spp., destas, 12 foram identificadas como *Listeria innocua* e 04 como *Listeria monocytogenes*. Os resultados deste trabalho demonstram que as bactérias *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* estão presentes em amostras de salsichas tipo hot dog a granel e em carne bovina homogeneizada a granel de estabelecimentos comerciais no Distrito Federal e a metodologia RFLP-PCR permitiu diferenciar as cepas isoladas neste tipo de alimento.

**Palavras chave:** 1. Diagnóstico Molecular. 2. *Listeria monocytogenes*. 3. RFLP-PCR. 4. Identificação de espécies de *Listeria* spp.

## ABSTRACT

The objective of this work was to verify the occurrence and identify, by biochemical analysis and (RFLP-PCR) of the 23S rRNA gene, the species of *Listeria* spp. in hot dog sausages and minced bovine meat sold in bulk commercialized in Distrito Federal, Brazil. The methodology used for this bacteriological isolation and biochemical tests for identification of the strains was used according to the Instrução Normativa n° 40, from December 16 2005, of the Ministry of Agriculture, Cattle Breeding and Supply of Brazil (MAPA), and, to the identification using RFLP-PCR according to Paillard *et al.*, (2003). A total of 162 samples, being 127 hot dog sausages and 35 samples of minced bovine meat were tested. From the 127 samples of hot dog sausages analyzed, 26 were positive to *Listeria* spp. and, from these, 18 were identified as *Listeria innocua* and 09 as *Listeria monocytogenes*, in both identifications by biochemical tests and RFLP-PCR. From the 35 samples of minced bovine meat tested, 16 were positive to *Listeria* spp., from these, 12 were identified as *Listeria innocua* and 04 as *Listeria monocytogenes*. The results of this work show that the bacteria *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* are found in hot dog sausages and bovine minced meat sold in bulk from commercial grocery stores in Distrito Federal and the RFLP-PCR methodology allowed the identification of the strains isolated in this kind of food.

**Key Words:** 1. Molecular Diagnostic. 2. *Listeria monocytogenes*. 3. RFLP-PCR.  
4. Identification of *Listeria* species.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Listeria* compreende seis diferentes espécies: *Listeria grayi*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri* e *Listeria welshimeri* (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001). A *Listeria monocytogenes* é considerada por muitos autores como a única espécie de *Listeria* patogênica para o homem e, conseqüentemente, a espécie de maior importância para a saúde pública. Porém, apesar de raras, existem evidências de que algumas cepas de *Listeria ivanovii* podem também ser potencialmente patogênicas para humanos (McLAUCHLIN, 1997). Todas as espécies do gênero são cosmopolitas e são facilmente encontradas no solo, nas fezes dos animais e na água (PAILLARD *et al.*, 2003).

A doença causada por esse gênero de bactéria é conhecida como listeriose. Os sintomas são semelhantes aos de uma gripe com febre persistente, podendo estar acompanhados de náuseas, vômitos e diarreia. Quando o microrganismo atinge o sistema nervoso do hospedeiro, a forma mais grave da doença, causa meningite ou meningoencefalite e pode levar o hospedeiro à morte. Caso ocorra listeriose em mulheres gestantes, pode ocorrer aborto, parto pré-maturo, malformações no feto e infecção generalizada no recém-nascido (LECUIT, 2007).

A associação recente da *Listeria monocytogenes* com doenças graves de origem alimentar sugere que a contaminação do alimento seja a principal forma de transmissão da listeriose humana. A maior parte dos casos desta doença em humanos ocorre em indivíduos imunossuprimidos, crianças e gestantes (JERSEK, 1999). A presença de qualquer espécie de *Listeria* nos alimentos de origem animal é indicativo de condição higiênica deficiente em alguma etapa do processo industrial e a qualidade da matéria prima. A coexistência de mais de uma espécie em um mesmo alimento é comum (LACIAR *et al.*, 2006).

Condições sanitárias deficientes durante o abate dos animais, cozimento inadequado, armazenamento impróprio e falta de higiene durante o preparo dos produtos cárneos são condições que podem predispor os indivíduos a se contaminarem e se tornarem portadores assintomáticos ou doentes (FARBER & PETERKIN, 1991).

A contaminação por *Listeria monocytogenes* nas indústrias alimentícias é considerado atualmente um dos maiores problemas de segurança alimentar (HAMDI *et al.*, 2007). Uma vez presente nas fábricas de processamento de alimentos de origem animal, a bactéria do gênero *Listeria* dificilmente é eliminada da indústria; isso ocorre devido ao fato da grande capacidade dessa bactéria em formar biofilmes. No interior do biofilme os microrganismos estão mais resistentes à ação de agentes físicos (água sob pressão, escovas, etc) e químicos (detergentes e desinfetantes) utilizados no procedimento de higienização de rotina na indústria de alimentos (PARIZI, 1998).

Todas as espécies do gênero *Listeria* possuem alta resistência à variação de temperatura, à variação de pH, ao tratamento com salmoura e ao vácuo (FRANCIOSA *et al.*, 2001). Portanto, após sua contaminação na indústria de alimentos, a bactéria dificilmente é eliminada e pode facilmente entrar na cadeia alimentar humana. Grande parte da contaminação dos alimentos por essas bactérias ocorre durante o processamento dos alimentos (AUTIO, 1999).

O meio científico foi despertado para o perigo da listeriose durante a década de 80, quando uma série de surtos ocorreram na América do Norte e Europa. A partir de 1988, principalmente nos países da Europa Central, pesquisadores passaram a investigar a listeriose como doença de origem alimentar (FABER & PETERKIN, 1991).

Um dos maiores desafios atualmente é a ausência de um método eficiente para se distinguir *L. monocytogenes* de outras espécies de *Listeria* associadas na mesma amostra de alimento, especialmente *Listeria innocua*. Muitos conflitos na literatura estão documentados a respeito da incerteza, uma vez confirmada a contaminação do alimento por *Listeria*, de qual espécie do gênero está presente no alimento contaminado. Nos últimos anos, poucos trabalhos fizeram distinção entre diferentes espécies de *Listeria* presentes em amostras isoladas de alimentos, a maioria deles faz menção apenas da presença de bactérias do gênero *Listeria* spp. (LACIAR *et al.*, 2006).

Tendo em vista a importância da listeriose no que se refere à sua detecção nos alimentos, principalmente os de origem animal, o objetivo deste trabalho foi realizar a verificação da presença desta bactéria, bem como a diferenciação das suas espécies, em amostra de salsichas tipo hot dog a

granel e carne bovina homogeneizada a granel comercializadas no Distrito Federal por análises microbiológicas e por análise de restrição de produtos de PCR (RFLP PCR) respectivamente.

## 2. JUSTIFICATIVA

Mesmo em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, onde o alimento é considerado um dos mais seguros do mundo, estima-se que anualmente 76 milhões de pessoas sejam acometidas por algum tipo de doença de origem alimentar, levando a 325.000 hospitalizações e 5.200 mortes (SCARCELLI & PIATTI, 2002). Em seu estudo, Lecuit (2007) e Long *et al.* (2008) relatam que aproximadamente 2500 pessoas ficam doentes devido à infecção por *Listeria monocytogenes* por ano nos Estados Unidos, e, destas, cerca de 500 (20%) chegam a óbito. Em seu estudo, Low & Donachie (1997), afirmaram que é difícil determinar a incidência da listeriose, mas a estimativa é de que ocorram 1700 novos casos da doença por ano nos EUA, e que, destes, aproximadamente 550 venham a óbito.

A partir da década de 80, muitos casos de listeriose foram diagnosticados em humanos na Europa e nos Estados Unidos em consequência da ingestão de alimentos contaminados, tornando-se uma doença de preocupação mundial na saúde pública. Os alimentos que estão mais freqüentemente associados à contaminação por *Listeria spp.* são: derivados de laticínios, patês, salsichas, carne de peixe, saladas e alimentos cárneos prontos para o consumo que não necessitam de serem cozidos ou aquecidos (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

A incidência de listeriose parece estar crescendo mundialmente. Essa situação é comprovada na Europa e Estados Unidos. A taxa de incidência de listeriose em humanos é considerada baixa, de 2 a 15 casos por milhão na Europa e nos EUA, com taxas publicadas variando de 1,6 a 14,7. A taxa de incidência mais alta, de 14,7 casos por milhão de habitantes ocorreu na França em 1986. Não se sabe se esse aumento da taxa de incidência é devido a uma proliferação e maior contaminação da *L. monocytogenes* nas indústrias de alimentos ou se é devido a um diagnóstico da doença mais eficiente (KONEMAN *et al.*, 2001). Apesar de ser considerada uma doença bacteriana rara, a listeriose em humanos tornou-se uma das doenças emergentes mais preocupantes para a saúde pública devido à sua alta taxa de letalidade. A taxa de letalidade da doença em humanos é considerada alta 20% a 30% (SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT 2007).

Segundo a Food and Agriculture Organization – FAO (1999) a partir da análise de alimentos contaminados com *L. monocytogenes*, para que ocorra infecção, é necessária a ingestão de contagens baixas do microrganismo (inferiores a  $10^2$  UFC/g). Partindo-se desses achados, pode-se dizer que doses iguais ou maiores de  $10^2$  UFC de *L. monocytogenes* /g podem causar quadro de toxinfecção alimentar (FAO, 1999).

O método de diagnóstico da reação em cadeia da polimerase (PCR) baseia-se na construção de oligonucleotídeos (óligos) específicos, extração do DNA do material a ser analisado e realização da reação propriamente dita. O tempo gasto para a execução da metodologia e detecção da bactéria é de aproximadamente 12 a 18 horas, sendo, portanto muito mais rápido e específico. O teste da PCR associada ao uso da análise do perfil de restrição com enzimas de restrição específicos (RFLP) permitiu a diferenciação e identificação das diferentes espécies do gênero: *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. welshimeri* e *L. seeligeri* (PAILLARD *et al.*, 2003).

Tendo em vista a importância deste microrganismo no contexto da saúde pública no que diz respeito à segurança dos alimentos de origem animal, e por se tratar de um microrganismo potencialmente patogênico, podendo até levar à morte, aliado ainda aos poucos relatos presentes na literatura nacional de sua presença em alimentos de origem animal, torna-se fundamental a verificação de sua presença nos alimentos para consumo humano. Sendo assim, este trabalho objetivou fazer uma verificação da ocorrência desta bactéria em salsichas tipo hot dog a granel e carne homogenizada bovina a granel comercializada no Distrito Federal, por análise microbiológica e ainda promover a diferenciação das seis espécies por RFLP-PCR do fragmento 23S rRNA, conforme descrito por PAILLARD *et al.*, (2003).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Verificar a presença de *Listeria* spp. em salsichas tipo hot dog e carne bovina homogeneizada comercializadas a granel no Distrito Federal e realizar a identificação das espécies por análise do perfil de restrição de produtos de PCR (RFLP-PCR).

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Promover o isolamento bacteriano do gênero *Listeria* spp. de amostras de salsichas tipo hot dog a granel e de carne homogeneizada bovina a granel comercializados no Distrito Federal, por análise microbiológica tradicional;

- A partir das cepas de *Listeria* spp. isoladas e com as espécies identificadas por testes bioquímicos, realizar a reação em cadeia da polimerase e a análise polimórfica com enzimas de restrição segundo protocolo descrito por Paillard *et al.*, (2003), sendo esta última ferramenta utilizada para diferenciar as espécies desta bactéria.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Agente etiológico

O gênero *Listeria* compreende bactérias coco-bacilos, de 0,4 a 1,5 µm de diâmetro de 0,5 a 2µm de comprimento, são gram-positivas, não esporulam, são anaeróbicas facultativas, intracelulares facultativos, móveis (principalmente entre 10 e 25°C) e que crescem em temperaturas que variam de 0,4°C até 50°C (FARBER & PETERKIN, 1991). São também capazes de crescer em pH que varia entre 4,3 a 9,6, em atividade de água (Aw) maior ou igual a 0,9, em concentrações de cloreto de sódio superiores a 10% e também em presença de concentrações aceitas de sais de nitrato e nitrito usados na conservação de carnes (0,015g/100g). Em seu estudo com carne de peixes, Suñen *et al.* (2002) observaram que a *L. monocytogenes* é capaz de crescer mesmo depois da carne ter sido defumada, embalada a vácuo, submetida à temperatura de refrigeração de 4°C por 21 dias, e submetida ao tratamento com cloreto de sódio a 4%.

Uma vez instalada nas fábricas de processamento de alimentos de origem animal, a bactéria do gênero *Listeria* dificilmente é eliminada da indústria; isso ocorre devido ao fato da grande capacidade dessa bactéria em formar biofilmes. Biofilmes são complexos ecossistemas microbiológicos embebidos em uma matriz de polímeros orgânicos, aderidos a uma superfície. Os biofilmes contém partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, entre outros, que formam uma espécie de proteção, debaixo da qual, os microrganismos continuam a crescer, formando um cultivo puro ou uma associação com outros microrganismos. Em determinados momentos, os biofilmes sofrem dispersão, liberando microrganismos que virão a colonizar novos ambientes ou alimentos (CARPENTIER & CERF, 1993).

## 4.2 Sistematização

A classificação referente a bactérias do gênero *Listeria spp.* é descrita abaixo:

Domínio: Bactéria

Filo: *Firmacutes*

Classe: *Bacilli*

Ordem: *Bacillales*

Família: *Listeriaceae*

Gênero: *Listeria*

Espécies: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria grayi*,  
*Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri* e *Listeria seeligeri*.

Low & Donachie (1997), afirmam que tendo como base estudos genômicos e fenotípicos realizados recentemente é ainda controversa a inclusão de *L. murray* e *L. grayi* no gênero. Stuart & Welshimer (1974), em seu estudo, propuseram transferir essas duas espécies para o gênero *Murraya*.

## 4.3 Características bioquímicas

A *Listeria spp.* é catalase positiva e oxidase negativa. Apenas espécies hemolíticas, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*, são associadas como potencialmente patogênicas para humanos e animais (COCOLIN *et al.*, 2002). São também D-xilose negativo, D-manitol negativo, L-ramnose positivo,  $\alpha$ -metil-D-manosídeo positivo, fermentam a glicose, vermelho de metila positivo, Voges Proskauer positivo, indol negativo, esculina positivo e não reduzem nitrato. As espécies de *Listeria spp.* que possuem atividade hemolítica (*Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* e *Listeria seeligeri*) expressam  $\beta$ -hemólise com a formação de zonas claras no ágar sangue (KASNOWSK, 2004).

#### **4.4 Histórico da listeriose**

O primeiro caso identificado de listeriose humana ocorreu em 1929, na Dinamarca, estabelecendo-se a partir de então a correlação entre *L. monocytogenes* e meningite em humanos (MANTILLA *et al.*, 2007). Em 1966 verificou-se a transmissão desta bactéria através dos alimentos; a partir de então casos esporádicos de listeriose começaram a ser observados em pessoas que mantinham contato com animais infectados (FARBER & PETERKIN, 1991). As ocorrências de casos de listeriose em sua forma neurológica têm aumentado consideravelmente no Brasil nos últimos anos (SCARCELLI & PIATTI, 2002).

Segundo Bem-Emberek (1994) em 1981, no Canadá, que começou-se a suspeitar da contaminação dos alimentos por *L. monocytogenes*, e, que esta poderia ser a principal via de infecção em humanos. A partir de então diversos estudos subseqüentes constataram que a contaminação do alimento é realmente a principal forma de transmissão da listeriose humana (JALLEWAR *et al.*, 2006; SIEGMAN-INGRA *et al.*, 2002).

#### **4.5 Habitat**

O habitat primário da *Listeria* é o solo e a água, mas também pode ser encontrada nas fezes dos animais e do homem, no leite das vacas sadias ou com mastite, e em restos provenientes de abatedouros. Os ruminantes domésticos atuam como importante reservatório desse grupo de bactérias, atuando como importante fonte de manutenção e disseminando o microrganismo no ambiente (VÁSQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; NIGHTINGALE *et al.*, 2004). Além disso, Nightingale *et al.* (2004) em seu estudo fizeram uma análise de prevalência em amostras de fezes de bovinos e pequenos ruminantes e concluíram que a *L. monocytogenes* está muito mais presente em propriedades de bovinocultura se comparado com propriedades rurais com criação de pequenos ruminantes.

#### 4.6 Patogenia da listeriose em humanos

No que diz respeito à sorologia, foram descritos 16 sorovares, sendo 15 antígenos somáticos “O” e quatro antígenos flagelares “H”. A maior desvantagem da sorotipagem é que ela não se correlaciona especificamente com a espécie de *Listeria* spp., ou seja, diferentes espécies de *Listeria* spp. compartilham o mesmo sorotipo (LOW & DONACHIE, 1997). Os sorovariantes 1/2 a, 1/2 b, 1/2c e 4b causam a maioria dos casos da doença em humanos, sendo responsáveis por 98% dos casos (BUCHRIESER, 2007).

Segundo Mantilla *et al.* (2007), a *L. monocytogenes* está representada por 13 sorovares, alguns dos quais são compartilhados por *L. innocua* e por *L. seeligeri*. Embora *L. innocua* esteja representada somente por três sorovares, muitas vezes esta é considerada uma variante não patogênica de *L. monocytogenes*. A grande heterogeneidade antigênica desta última espécie pode estar relacionada com o grande número de hospedeiros animais nos quais é capaz de multiplicar-se. Em geral, linhagens 4b são mais freqüentemente associadas com surtos, enquanto linhagens 1/2 são mais relacionadas com contaminação em produtos alimentícios.

A maior parte dos casos de listeriose ocorre em indivíduos imunossuprimidos, idosos e gestantes (LOW & DONACHIE, 1997; PETTINATI *et al.*, 2006). A listeriose é comumente uma doença muito severa. É uma das doenças bacterianas que mais causam a morte de humanos. A taxa média de letalidade da doença é de 20 a 30%. É estimado que 10% de todas as meningites causadas por bactérias sejam devido à infecção por *Listeria monocytogene* (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001). Já Shen *et al.* (2006) defendem que a taxa de mortalidade em indivíduos adultos não gestantes gira em torno de 20-25%. Casos de listeriose em humanos causados por *Listeria ivanovii* e *Listeria seeligeri* são raros (McLAUCHLIN, 1997; COCOLIN *et al.*, 2002).

Em um trabalho pioneiro, Mackaness em 1962 demonstrou que *L. monocytogenes* é capaz de sobreviver e se multiplicar dentro de macrófagos; desde então esse microrganismo tem sido utilizado em pesquisas que precisam de um modelo de parasita intracelular de células do sistema imune (GEOFFROY *et al.*, 1991).

No final da década de 80 foi descoberto na *L. monocytogenes* o gene *hly*, responsável pela produção da hemolisina em *L. monocytogenes*, também denominada listeriolisina O (LLO). Essa foi a descoberta do primeiro gene de virulência de *Listeria* e também o primeiro produto de gene que atua na proteção do parasita dentro de uma célula eucariótica. A listeriolisina O é uma importante enzima que ajuda a bactéria a escapar da ação de enzimas dos fagossomos do sistema imune do hospedeiro. Dentro do fagossomo o pH é mais ácido, isso estimula a bactéria a liberar a listeriolisina O que começa a desestabilizar a membrana do fagossomo, e, assim, induz a formação de poros em sua membrana, até o seu completo rompimento. Após esse rompimento, enzimas hidrolíticas são liberadas no citosol da célula hospedeira, provocando sua destruição (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

Rousseaux *et al.* (2004) afirmam que a patogenia da doença começa com a adesão da *Listeria monocytogenes* na superfície das células epiteliais intestinais. Essa adesão ocorre por meio de proteínas de superfície específicas do gênero *Listeria* spp., denominadas Internalina A (InIA) e Internalina B (InIB). Os autores afirmam ainda que, além da atividade hemolítica presente em apenas algumas espécies de *Listeria* spp., a não virulência das espécies apatogênicas para humanos pode ser devido a mutações ocasionadas no gene que codifica as proteínas de superfície nestas espécies.

VÁZQUEZ-BOLAND *et al.* (2001), em seu estudo, descreveram os fatores de virulência e patogenicidade associados com *Listeria monocytogenes*, afirmando que, além da ação da listeriolisina O, principal responsável pelo escape da bactéria do interior do fagossomo, a liberação de fosfolipases hidrolisam a membrana lipídica da célula hospedeira e causam sua ruptura.

#### **4.7 Sinais clínicos da listeriose em humanos**

O período de incubação da *Listeria monocytogenes* desde a contaminação, através da ingestão de água ou alimento contaminado, até o aparecimento dos primeiros sintomas pode variar de 10-70 dias. Esse fato dificulta a descoberta da fonte de contaminação no caso de surto da doença. Os sinais clínicos de uma pessoa portadora de listeriose não são específicos e com freqüência são confundidos com sintomas de uma gripe. Os sintomas

mais comuns são: cansaço, mal-estar, febre, mialgia e dores de cabeça em virtude do quadro de bacteremia. Pode ocorrer ainda, gastroenterite, endocardite, pneumonia, vômito, artrite, doenças oculares, hepatite, cólicas e falta de apetite. Nos casos em que a infecção consegue se desenvolver sistemicamente e atingir o sistema nervoso do hospedeiro (na grande maioria dos casos ocorre em indivíduos imunossuprimidos), desenvolve meningite ou meningoencefalite com exibição de sintomatologia nervosa. Em gestantes pode ocorrer malformações no feto, parto prematuro e aborto (LECUIT, 2007). Indivíduos imunocompetentes também podem desenvolver doença sistêmica caso ocorra a ingestão de altas doses de uma cepa virulenta de *L. monocytogenes* (SIEGMAN-INGRA *et al.*, 2002).

#### **4.8 Listeriose nos animais**

A bactéria *Listeria monocytogenes* é a espécie de *Listeria* spp. que mais causa surtos de listeriose nos animais. A listeriose nos animais é comum em todos os seis continentes e já foi reportada em mais de 40 espécies de animais incluindo selvagens e domésticos (LOW & DONACHIE, 1997). Segundo Mantilla *et al.* (2007) a *Listeria monocytogenes* é o agente etiológico envolvido em aproximadamente 85% dos casos de listeriose em animais.

Os surtos de listeriose em animais, particularmente nos ovinos, parecem ser mais frequentes em clima frio e úmido. Animais que apresentam estresse nutricional são mais predispostos. Embora menos freqüentes que infecções provocadas por *L. monocytogenes*, é relativamente comum o desenvolvimento de listeriose provocados por *Listeria ivanovii*. As manifestações clínicas da doença em animais se assemelham aos sintomas provocados por *L. monocytogenes* em humanos, são eles: meningite, encefalite, meningoencefalite, aborto, prostração e perda de peso. Na necropsia de fetos abortados é comum a presença de fluido sanguinolento nas cavidades corporais (cavidade peritoneal e cavidade torácica) e no espaço subcutâneo. Pode ocorrer presença de necrose multifocal coagulativa no fígado que são rodeados por macrófagos e neutrófilos. Os focos necróticos no fígado de ovinos são bem demarcados e são particularmente mais abundantes no lobo direito do órgão (SAHIN & BEYTUT, 2006).

Segundo Gil (2000) e o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (BRASIL, 2008), este último ainda em consulta pública, na indústria de carnes, na ocasião da inspeção *ante mortem*, os animais que apresentam sintomatologia nervosa, que pode ser sugestivo de listerioses, são abatidos em separados e, em se confirmando a suspeita, a carne é reprovada para ao consumo humano.

#### **4.9 Importância da *Listeria monocytogenes* nos alimentos**

A principal via de transmissão da listeriose para o homem e animais é através da ingestão de água e alimentos contaminados (SIEGMAN-INGRA *et al.*, 2002). A *Listeria monocytogenes* é a única espécie do gênero *Listeria* associada a surtos de listeriose transmitidas por alimentos (Cocolin *et al.*, 2002). Baixas contagens de *Listeria monocytogenes* no alimento são capazes de causar infecção no homem. Vázquez-Boland *et al.* (2001) afirmaram que já houve relato de listeriose humana adquirida com a ingestão de apenas 10<sup>2</sup> UFC da bactéria por grama no alimento. A dose do microrganismo capaz de provocar listeriose nas pessoas depende da patogenicidade e virulência da cepa envolvida na infecção, além do fator de risco associado com o hospedeiro tais como idade, imunossupressão e gestação. Atualmente, no Brasil não existe legislação para um limite específico estipulado para a presença de *L. monocytogenes* nos alimentos, entretanto, de acordo com a RDC n° 12 (BRASIL, 2001), são considerados produtos de condições insatisfatórias aqueles que demonstram a presença de microrganismos patogênicos (MANTILLA *et al.*, 2007).

Em geral, o microrganismo parece ser capaz de sobreviver na carne processada mesmo após sofrerem tratamento durante o processo de industrialização. A refrigeração, a desidratação, a cura da carne e o empacotamento a vácuo parece não diminuir a infectividade desta bactéria (FARBER & PETERKIN, 1991).

A ingestão de bactérias do gênero *Listeria* é um evento muito comum, devido à distribuição ubiqüitária da bactéria e da grande freqüência com que se encontra o microrganismo nos alimentos (SIEGMAN-INGRA *et al.*, 2002). A incidência da listeriose humana é considerada baixa, variando entre 0,1 a 11,3

casos anuais por milhão de habitantes na Europa e nos EUA (SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007). Apesar disso, é uma enfermidade importante para a saúde pública devido à sua alta taxa de letalidade que varia de 20-50% dos casos (MANTILLA *et al.*, 2007).

A maior parte da contaminação observada em carnes foi isolando de amostras de superfície desses alimentos (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001). Segundo Farber e Peterkin (1991), quando a bactéria é isolada no interior da musculatura do animal, pode ser sugestivo que esta já estava presente na musculatura antes do abate desse animal, e não se trata de contaminação durante alguma etapa de processamento deste produto.

Jay (1996) relata que dentre as espécies de *Listeria* identificadas em amostras de carnes, as mais predominantes são *L. monocytogenes* e *L. innocua*. A terceira espécie mais predominante em carnes é a *L. welshimeri*, seguida pela *L. seeligeri* e a *L. ivanovii*. A prevalência da *L. grayi* em carnes não é citada por este autor.

Mantilla *et al.* (2007), relatam que as bactérias do gênero *Listeria* spp. vêm sendo isoladas de uma grande variedade de fontes, e, em muitas situações, a *Listeria innocua* é mais comumente isolada que a *Listeria monocytogenes*.

Jalali (2008), afirmam que o primeiro passo para convencer autoridades fiscalizadoras e a indústria privada da importância da *Listeria* em alimentos é fornecendo dados de ocorrência desta bactéria em vários tipos de alimento.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Origem das amostras

Foram adquiridas 127 amostras de salsichas tipo hot dog a granel e 35 amostras de carne bovina homogeneizada (carne moída) ambas comercializadas a granel de estabelecimentos comerciais localizados no Distrito Federal. As amostras foram compradas de estabelecimentos comerciais diversos, simulando assim uma situação real de compra pelo consumidor, e onde cada unidade de amostra adquirida era composta por 50g de carne homogeneizada bovina ou duas salsichas; essas amostras foram individualizadas em sacos plásticos do próprio estabelecimento. Em cada um dos estabelecimentos comerciais foram adquiridas cinco amostras de cada matriz (salsicha tipo hot dog e carne homogeneizada bovina) de diversas marcas. Essas amostras foram então acondicionadas em refrigerador a 4° C até o dia seguinte, quando procedeu-se ao isolamento microbiológico das amostras adquiridas.

### 5.2 Isolamento microbiológico da *Listeria* spp.

A etapa de isolamento microbiológico do gênero *Listeria* foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. A metodologia utilizada foi a preconizada pela Instrução Normativa n° 40, de 16 de dezembro de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil.

No interior de uma câmara de fluxo laminar<sup>1</sup>, foram pesados 25g de cada amostra matriz (salsicha tipo hot dog e carne bovina homogeneizada a granel) dentro de um saco estéril para homogeneização de amostras, acrescentando 225 mL de Caldo de enriquecimento da Universidade de Vermont Modificado (caldo UVM), também denominado caldo de enriquecimento primário de *Listeria* (LEB 1), e homogeneizado no Stomacher<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Veco®, Campinas, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Homogeneizador Mayo International, Baranzati di Bollate, Itália.

por 2 minutos. A amostra foi incubada em estufa bacteriológica<sup>3</sup> a 37° C por 24 horas. A seguir, transferiu-se, com auxílio de uma pipeta esterilizada, 0,1 mL do caldo UVM para 10 mL de caldo Fraser (FB). A amostra foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 24h. Então, a partir do caldo UVM pré-incubado, foi distribuído aproximadamente 10µL do mesmo, com auxílio da alça de platina, sobre a superfície de uma placa contendo Ágar Oxford Modificado (ágar MOX), de modo a se obter colônias isoladas. A placa foi incubada a 37°C por 24h. Após esse período, buscou-se no ágar MOX a presença de colônias isoladas com diâmetro de aproximadamente 1 mm e com halo de escurecimento devido à hidrólise da esculina. Após esta etapa, apenas uma colônia dessa amostra do ágar MOX, foi distribuída em uma placa de ágar com 7% de sangue de carneiro (ágar sangue) a qual foi mantida em estufa bacteriológica a 37°C por 24h. Em seguida uma colônia foi selecionada para a realização da coloração de Gram e ao teste do KOH 3% para confirmação de bactérias Gram positiva. Caso as bactérias sejam confirmadas Gram positivas, foram realizados os testes da catalase (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), oxidase e oxidação e fermentação (OF) da glicose. Bactérias do gênero *Listeria* são catalase positiva, oxidase negativa. O teste de OF da glicose é usado em conjunto com óleo mineral para simular um ambiente anaeróbico, uma vez que a *Listeria* spp. é anaeróbia facultativa. Neste teste, transferiu-se uma colônia para cada um dos dois tubos de ensaio, sendo que, em um deles, além do OF glicose, acrescentou-se uma fina camada de óleo mineral; o outro tubo apenas com OF glicose (sem o óleo mineral). Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24h. Para o teste de motilidade, uma colônia foi transferida da placa de ágar-sangue de carneiro 7% para o caldo de cérebro e coração (BHI), a qual foi incubada em estufa bacteriológica<sup>4</sup> a 25°C por 24h. Posteriormente, com auxílio da alça de platina, pegou-se uma gota do tubo com BHI e pôs-se em uma lâmina para análise de motilidade no microscópio de contraste de fases<sup>5</sup>. O objetivo desta etapa foi a observação de pequenos bastões com movimento ativo de cambalhota, característico do gênero *Listeria*.

---

<sup>3</sup> Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil.

<sup>4</sup> Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil.

<sup>5</sup> Olympus BX41TF, Japão.

Deste modo, nas colônias que apresentavam morfologia celular típica, eram *Gram* positiva, apresentaram resultado positivo no teste da catalase, resultado negativo no teste da oxidase, positivo no teste da OF glicose com óleo mineral e motilidade em cambalhota, foi feita a confirmação bioquímica através do teste API<sup>®</sup>-Listeria.

### **5.3 Teste bioquímico complementar pelo kit API<sup>®</sup> – Listeria**

Para a realização do teste bioquímico complementar, foram utilizados os kits comerciais API-Listeria<sup>®6</sup>. Para isso seguiu-se o protocolo descrito pelo fabricante, levando-se em consideração que a concentração de *Listeria* spp. para a realização do teste bioquímico foi de 1 na escala MacFarland. Para a leitura dos testes foram seguidos os procedimentos presentes no manual de utilização do mesmo.

### **5.4 Diagnóstico molecular: pcr e análise de restrição para diferenciação das espécies de *Listeria* spp.**

#### **5.4.1 Origem do controle positivo**

Uma amostra de referência de *Listeria monocytogenes* foi adquirida da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – Rio de Janeiro) e foi utilizada como controle positivo para a padronização da PCR e da análise de restrição.

#### **5.4.2 Extração e quantificação de DNA do controle positivo**

Para realizar a extração de DNA do controle positivo, a cepa de *Listeria* foi plaqueada em ágar sangue de carneiro a 7% e foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 24h. Após este período, uma colônia da placa foi selecionada e inoculada em um tubo tipo falcon de 15ml, contendo 3ml de caldo L (peptona de caseína 1%, extrato de levedura 0,5% e cloreto de sódio 1%) esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. Após a inoculação da

---

<sup>6</sup> API<sup>®</sup>-Listeria, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França.

colônia no caldo L, a amostra foi mantida no homogeneizador tipo shaker<sup>7</sup> à 200 rpm, 37°C por 12h. Desta cultura de bactéria presente em 3ml de meio L, foram utilizados 400µl para proceder à extração de DNA. Para realizar a extração de DNA da amostra, utilizou-se o fenol/clorofórmio (1:1) segundo protocolo descrito por Sambrook *et al.*, (2001). Posteriormente, foi realizada a quantificação de DNA total da amostra. Para isto, utilizou-se o marcador de massa molecular High Mass<sup>®</sup> Ladder Invitrogen<sup>®</sup>. A visualização do DNA total foi realizada em gel de agarose 0,8% com adição de brometo de etídio na concentração de 0,02% e visualizadas em equipamento de luz ultravioleta<sup>8</sup>.

#### 5.4.3 Realização da PCR e quantificação de DNA (*amplicon*) para o controle positivo

Para esta reação foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos (*primers*), S1 e S2, segundo metodologia descrita por Paillard *et al.* (2003). As seqüências dos oligonucleotídeos S1F, S1R, S2F e o S2R encontram-se no Quadro 01, sendo que os mesmos amplificam fragmentos de 460bp e 890bp, respectivamente do gene 23S rRNA.

Quadro 1. Seqüência de oligonucleotídeos S1 e S2 para *Listeria* spp.

S1 (460bp)	S1F	5' agtcggatagtagtcttac 3'
	S1R	5' ggctctaactactgttaggc 3'
S2 (890bp)	S2F	5' gcctacaagtagttagagcc 3'
	S2R	5' actggtacaggaatctctac 3'

<sup>7</sup> New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA.

<sup>8</sup> Vilbert Lourmat, Marne La Vallee, França.

A programação utilizada para a amplificação dos fragmentos no termociclador<sup>9</sup> está representada abaixo.

- 29  
CICLOS
- 95°C – 2min;
  - 94°C – 1min;
  - 57°C – 1min;
  - 72°C – 2,5min;
  - 72°C – 5min;
  - 4°C – até a retirada das amostras do termociclador.

As concentrações das soluções para a realização da PCR para a amplificação de cada um dos fragmentos S1 (460bp) e S2 (890bp) de DNA, encontram-se no Quadro 02.

Quadro 02. Concentração dos reagentes da PCR utilizados para obtenção dos fragmentos S1 e S2.

Reagentes	Concentração final	Marca
DNTP (2 mM) 10X	1X	Amershand®
Tampão 10X	1X	Cembiot-RS
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	~ 2,5mM	Cembiot-RS
Taq DNA polimerase	2U/ µl	Cembiot-RS
Primer 5'	10 pmoles/ µL	*
Primer 3'	10 pmoles/ µL	*
Template	4 ng/ µl DNA total	—

\* Produzidos por diferentes empresas.

Para completar o volume final de 50 µl, foi utilizado água milli-Q esterilizada. Posteriormente, foi realizada a quantificação de DNA (*amplicon*) dos produtos de PCR S1 e S2 da amostra. Para isto, utilizou-se o marcador de massa molecular Low Mass Ladder Invitrogen®. A visualização e quantificação dos *amplicons* S1 e S2 foi realizada em gel de agarose 1,5% com adição de

<sup>9</sup> PTC-100, M.J Research Inc., Watertown, USA.

brometo de etídio na concentração de 0,02% e visualizado em equipamento de luz ultravioleta<sup>10</sup>.

#### 5.4.4 Realização da RFLP-PCR para o controle positivo

Para a identificação e confirmação da espécie do controle positivo (*Listeria monocytogenes*), foram realizadas duas análises de restrição (RFLP) do *amplicon* de 890bp (S2), obtidas através de digestões com as enzimas de restrição *Xmnl* e *Cfol*, segundo metodologia proposta por PAILLARD *et al.* (2003).

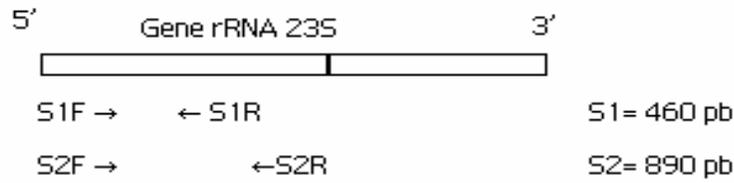
O protocolo seguido para cada reação de digestão é descrito a seguir: 100ng do *amplicon* S2 (890pb), Tampão Multi-Core<sup>TM11</sup> 10X na concentração final de 1X, 10µg/µl de BSA acetilado, 2U da enzima a ser utilizada e completou-se com H<sub>2</sub>O milli-Q esterilizada para o volume final de 25 µl. Após o preparo da reação de digestão do *amplicon* S2 (890bp), o mesmo foi submetido à incubação em banho-maria a 37 °C por 2 horas. Os perfis de restrição, após a incubação com as enzimas, foram visualizados em gel de agarose 2,0% contendo brometo de etídio na concentração de 0,02% em equipamento de luz ultravioleta. A estratégia da realização das digestões dos *amplicons* S1 (460bp) e S2 (890bp), segundo o protocolo descrito por Paillard *et al.* (2003) encontra-se descrito abaixo na Figura 01. A sequência de nucleotídeos reconhecida por cada enzima de restrição está representada no Quadro 03.

Quadro 03. Seqüência de nucleotídeos reconhecida por cada enzima de digestão.

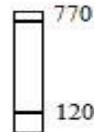
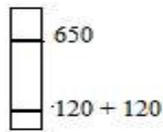
ENZIMA	SEQUENCIA ALVO
<i>Xmnl</i>	5'...GAANN <sup>▼</sup> NNTTC.. 3'
<i>Cfol</i>	5'...GCG <sup>▼</sup> C...3'
<i>Alul</i>	5'...AG <sup>▼</sup> CT.. 3'
<i>Clal</i>	5'...AT <sup>▼</sup> CGAT.. 3'

<sup>10</sup> Vilbert Lourmat, Marne La Vallee, França.

<sup>11</sup> Promega Corporation, Madison, USA.



Digestão XmnI / S2



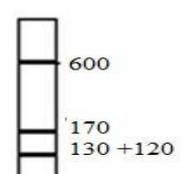
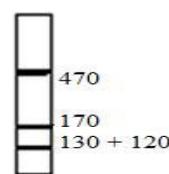
*Listeria grayi, Listeria innocua  
e Listeria welshimeri*

*Listeria monocytogenes, Listeria seeligeri  
e Listeria ivanovii.*



Digestão CfoI / S2

Digestão CfoI / S2



*Listeria grayi*

*Listeria innocua  
Listeria welshimeri*

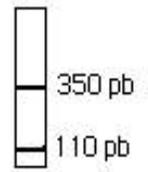
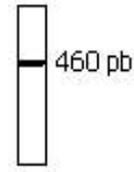
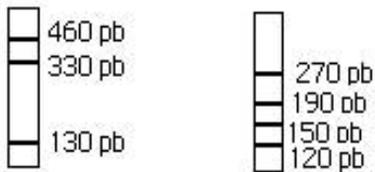
*Listeria monocytogenes*

*Listeria seeligeri  
Listeria ivanovii*



Digestão AluI / S1

Digestão ClaI / S1



*Listeria innocua*

*Listeria welshimeri*

*Listeria ivanovii*

*Listeria seeligeri*

Figura 01. Esquema utilizado para diferenciação de espécies de *Listeria* por PCR-RFLP. Os dois fragmentos, S1 (460pb) e S2 (890pb) do gene 23S rRNA,

foram amplificados com os *primers* S1F/ S1R e S2F/ S2R respectivamente. O produto de PCR S2 foi cortado primeiramente com a endonuclease *XmnI*, resultando em um dos dois perfis demonstrados: 650pb, 120pb e 120pb para as espécies de *L. grayi*, *L. innocua* ou *L. welshimeri* e no outro perfil de 770pb e 120 pb para *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* ou *L. Ivanovii*. Na próxima etapa, a restrição do produto de PCR S2 (890pb) pela *CfoI* individualiza a *L. grayi* (600pb, 170pb, 120pb) e *L. Monocytogenes* (470pb, 170pb, 130pb e 120pb). O perfil de *L. innocua* ou *L. Welshimeri* (470pb, 170pb, 130pb e 120pb) e o perfil de *L. Seeligeri* ou *L. Ivanovii* (600pb, 170pb e 120pb) são presuntivos. A digestão do produto de PCR S1 (460pb) com a enzima *AluI* diferencia a *L. innocua* (460pb, 330pb e 130pb) da *L. Welshimeri* (270pb, 190pb, 150pb e 120pb) e a digestão do S1 por *Clal* diferencia a *L. Ivanovii* (460pb) da *L. Seeligeri* (350pb e 110pb). Os tamanhos das bandas são indicadas por pares de bases. Adaptação de Paillard *et al.* (2003).

## **5.5 Extração de DNA das cepas de *Listeria* spp. isoladas de salsichas tipo hot dog a granel e carne bovina homogeneizada a granel**

Para realizar a extração de DNA das cepas de *Listeria* spp. isoladas por análises microbiológicas de salsichas tipo hot dog a granel e carne bovina homogeneizada a granel, utilizou-se mesmo protocolo de extração de DNA descrito anteriormente para o controle positivo.

### **5.5.1 Realização da PCR das cepas de *Listeria* spp. isoladas de salsichas tipo hot dog a granel e carne bovina homogeneizada a granel**

Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) das cepas de *Listeria* spp. previamente isoladas das amostras deste estudo, foi seguido mesmo protocolo descrito para a realização da PCR do controle positivo. Os oligonucleotídeos utilizados foram os S1F/ S1R e S2F/ S2R, ambos na concentração de 10pmoles. Os procedimentos de eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualização em aparelho de luz ultravioleta foram os mesmos

descritos para o controle positivo. A fotodocumentação foi feita no equipamento modelo BP 66 Torcy<sup>12</sup>.

### **5.5.2 Realização da RFLP-PCR das cepas de *Listeria* spp. isoladas de salsichas tipo hot dog e carne bovina homogeneizada**

A análise do polimorfismo dos fragmentos S1 (460bp) e S2 (890bp) por restrição foi realizada conforme estratégia previamente descrita, adaptada de Paillard *et al.* (2003), com a utilização das enzimas de restrição *XmnI*, *CfoI*, *AluI* e *Clal*. Em todas as cepas de *Listeria* spp. encontradas neste estudo foram realizados a PCR e a análise de restrição para a diferenciação das espécies. Os resultados obtidos da diferenciação das espécies por RFLP PCR foram comparados com os resultados de identificação das espécies pelo método bioquímico.

### **5.6 Análise estatística da ocorrência de cepas de *Listeria* spp. nas amostras de salsichas tipo hot dog e carne bovina homogeneizada comercializadas no Distrito Federal**

A metodologia desenvolvida para avaliação de risco é do tipo qualitativa e não quantitativa e foi aplicada para estimar a probabilidade de contaminação de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* em salsichas tipo hot dog e carne bovina homogeneizada comercializadas a granel no Distrito Federal.

Para a análise estatística dos dados obtidos da ocorrência de cepas de *Listeria* spp. foi utilizado o software @RISK 5.0<sup>13</sup>. Este software é utilizado para fazer uma análise de risco da probabilidade de contaminação de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* a partir da obtenção da frequência e média aparente das amostras testadas.

---

<sup>12</sup> Vilber Lourmat, Marne La Vallee, França.

<sup>13</sup> Palisade @RISK 5.0 para Microsoft Excel.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Ocorrência de cepas de *Listeria* spp. em amostras de salsichas tipo hot dog a granel

Das 127 amostras de salsicha tipo Hot Dog foram isoladas 26 (20.4%) cepas de *Listeria* spp.. Os resultados da análise de identificação bioquímica realizada pelo kit Api<sup>®</sup>-*Listeria* revelaram que das 26 cepas de *Listeria* spp isoladas, 8 (6,2%) cepas eram de *Listeria monocytogenes* (Figura 02) e 18 (14,1%) eram de *Listeria innocua* (Figura 03).

Estes resultados são similares aos observados por Petinati *et al.*, (2006) em que estes autores verificaram 55,4% de presença de *Listeria monocytogenes* em amostras de salsicha tipo hot dog comercializadas na cidade de São Paulo, entretanto estes autores não realizaram a identificação das outras espécies de *Listeria*. Semelhantemente, Borges *et al.*,(1999) em seu estudo de ocorrência de *Listeria monocytogenes* em salames na cidade do Rio de Janeiro, observaram que, de 81 amostras testadas, 12 (14,8%) estavam contaminadas por *Listeria* spp.. Destas amostras positivas, 6 (50%) foram identificadas como *Listeria innocua* e 6 (50%) como *Listeria monocytogenes*.

A presença de *Listeria monocytogenes* em salsicha fermentada (chouriço turco) também foi verificada por Colak *et al.* (2007), onde estes autores verificaram a ocorrência desta bactéria em 300 amostras deste alimento em Istambul, Turquia. Das 300 amostras analisadas, 63 (21%) estavam contaminadas com bactérias do gênero *Listeria* spp., sendo que destas amostras positivas, 35 (11,6%) foram identificadas como *Listeria monocytogenes*. Semelhantemente aos resultados obtidos por estes autores, Mena *et al.* (2004) em seu trabalho, verificaram a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em diversos produtos alimentícios comercializados em Portugal. Neste estudo, os autores afirmam que de 27 amostras de chouriço turco analisadas apenas uma (3,7%) estava contaminada por essa bactéria.

Vale ressaltar que a contaminação por *Listeria monocytogenes* em alimentos prontos para consumo, como por exemplo a salsicha tipo hot dog, é mais preocupante do que a contaminação por essa bactéria em alimentos que serão submetidos ao cozimento. Isso se deve ao fato de muitas pessoas terem

o hábito de consumir esses produtos sem antes submetê-lo a nenhum tipo de tratamento térmico.

A presença desta bactéria sugere falhas no procedimento de boas práticas de fabricação em alguma etapa do processamento, transporte ou comercialização de alimentos. Autio *et al.* (1999) avaliaram os pontos de contaminação de peixes na indústria, e concluíram que, na maioria dos casos, a contaminação da carne desses animais ocorre durante o seu processamento.

Este estudo permitiu verificar a presença das bactérias *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* em salsichas tipo hot dog a granel e em carne bovina homogeneizada a granel em estabelecimentos comerciais no Distrito Federal.

A metodologia de isolamento de *Listeria monocytogenes* proposta pela Instrução Normativa n° 40, de 16 de dezembro de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, foi eficaz e proporcionou o isolamento de culturas puras de bactérias do gênero *Listeria spp.* O inconveniente desse método foi o tempo necessário para a obtenção das colônias puras, de aproximadamente sete dias, e o custo elevado dos meios de cultura necessários para o isolamento de *Listeria spp.* conforme metodologia proposta. Este tempo pode ser diminuído com o desenvolvimento de um protocolo que utilize o DNA de cepas de *Listeria spp.* extraído diretamente de um meio seletivo para *Listeria spp.*, como por exemplo o caldo Fraser.

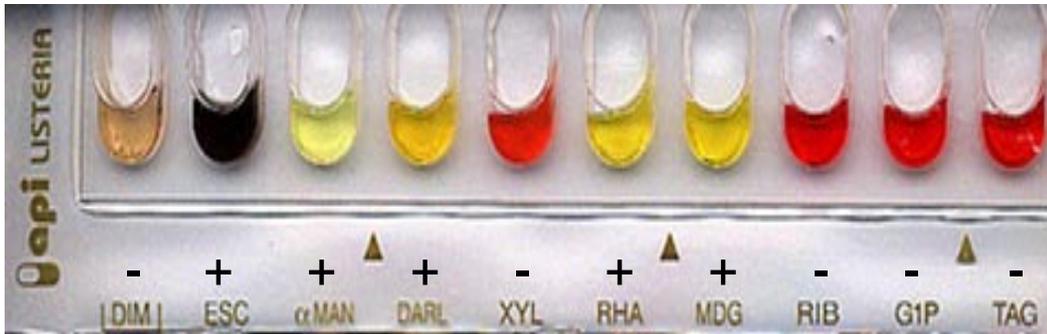


Figura 02. Figura do perfil de *Listeria monocytogenes* observado no teste do API® -Listeria - bioMérieux®. Substrato enzimático (DIM) negativo; esculina (ESC) positivo; 4-nitrofenil αD nanopirosídio (αMAN) positivo; D-Arabitól (DARL) positivo; D-Xylose (XYL) negativo; Rhaminose (RHA) positivo; metil-αD-glicopiranosídeo (MDG) positivo; D-ribose (RIB) negativo; glicose-1-fosfato (G1P) negativo e D-tagatose negativo.

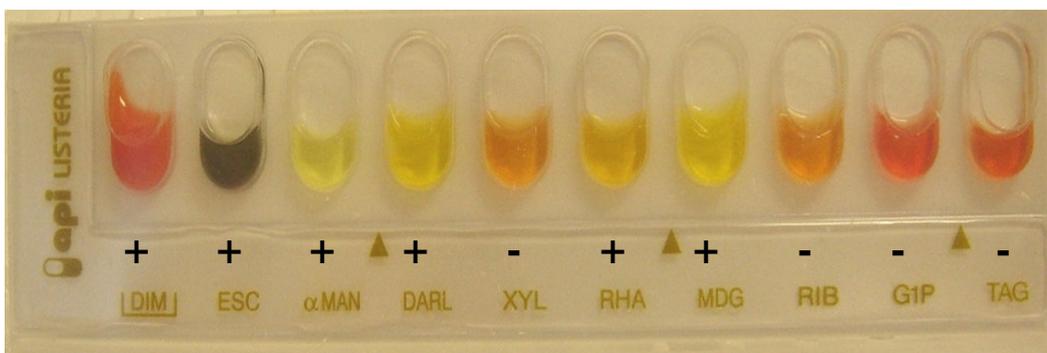


Figura 03. Figura do perfil de *Listeria innocua* observado no teste do API® -Listeria, bioMérieux. Substrato enzimático (DIM) positivo; esculina (ESC) positivo; 4-nitrofenil αD nanopirosídeo (αMAN) positivo; D-Arabitól (DARL) positivo; D-Xylose (XYL) negativo; Rhaminose (RHA) positivo; metil-αD-glicopiranosídeo (MDG) positivo; D-ribose (RIB) negativo; glicose-1-fosfato (G1P) negativo e D-tagatose negativo.

## 6.2 Ocorrência de cepas de *Listeria* spp. em amostras de carne bovina homogeneizada a granel

Das 35 amostras de carne bovina homogeneizada a granel, foram isoladas 16 (45,7%) cepas de *Listeria* spp.. Os resultados da análise

bioquímica realizada pelo kit Api<sup>®</sup> Listeria revelaram que dessas 16 cepas de *Listeria* spp isoladas, 4 (11,4%) eram de *Listeria monocytogenes* e 12 (34,2%) eram de *Listeria innocua*.

Estes resultados se assemelham com os obtidos por Kasnowski (2004) onde este relata que de um total de 173 cepas de *Listeria* spp., isoladas de alcatra bovina, na cidade do Rio de Janeiro, 72 (41,62%) eram originárias de peças inteiras (cortes) e 101 (58,38%) foram isoladas de carne bovina homogeneizada. A espécie *Listeria innocua* foi a mais observada, seguida pela *Listeria monocytogenes*. Esses resultados também se assemelharam aos de Mantilla *et al.* (2007) em que foi verificado a presença de *Listeria* spp. em 30 amostras de carne bovina homogeneizada também na cidade do Rio de Janeiro, no qual 15 (50%) estavam contaminadas com *Listeria* spp.e, desse total, 13 (86%) eram *Listeria innocua* e 02 (14%) *L. monocytogenes*. Assim como no presente trabalho, os autores também isolaram somente a *Listeria innocua* e *L. monocytogenes* neste tipo de alimento. Okten *et al.* (2006) em seu estudo de prevalência de *Listeria monocytogenes* em carne moída na Turquia, verificaram que 13,75% das amostras estavam contaminadas por essa bactéria. Mantilla *et al.* (2007) justificam que a carne bovina homogeneizada é um alimento que possui maior risco de contaminação por *Listeria* spp. uma vez que é preciso a manipulação para sua fabricação. Além da manipulação, este tipo de alimento possui maior área de superfície, o que possibilita maior chance de contaminação por bactérias. Esta mesma característica pode ser sugerida para justificar a presença desta bactéria neste trabalho, entretanto um estudo mais aprofundado deve ser conduzido no sentido de se verificar qual ou quais os principais pontos de incorporação desta bactéria neste tipo de alimento.

Em seu estudo de prevalência de *Listeria* spp. de cepas isoladas em produtos cárneos em vários países (entre os anos de 1971 e 1994), Jay *et al.* (1996) afirmam que a contaminação de *Listeria monocytogenes* é altamente variável neste tipo de alimento, e que a ocorrência média desta bactéria encontrada foi de 16%. Segundo estes autores, a detecção desta bactéria em carnes era esperada devido à sua ampla disseminação na natureza, e, também sugere que essa bactéria esteve sempre presente nos produtos cárneos e seus derivados. Esses autores sugerem ainda que devido a elevada taxa de contaminação por *L. monocytogenes* em carnes, aliado ao número elevado de

microrganismos por grama de alimento, esta pode ser usada como indicadora biológica de contaminação ambiental ou fecal.

Mena *et al.* (2004) em seu estudo de ocorrência de *Listeria monocytogenes* em diversos produtos alimentícios comercializados em Portugal, relatam que de 17 amostras de carne crua analisadas, 3 (17.7%) estavam contaminadas por essa bactéria. Estes autores afirmam ainda que a ocorrência desta bactéria em carnes cruas se deve ao fato da natureza ubiqüitária da mesma.

Neste estudo, o objetivo principal foi verificar a ocorrência de *Listeria* spp. em salsichas tipo hot dog a granel e carne bovina homogeneizada no Distrito Federal, uma vez que não havia dados da presença destes microrganismos nestes dois tipos de alimento nesta região, e assim como para a matriz salsicha tipo hot dog, a presença desta bactéria sugere falhas nas boas práticas de fabricação.

### **6.2.1 Análise estatística da ocorrência de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* em salsichas tipo hot dog a granel e carne bovina homogeneizada a granel no Distrito Federal**

Os dados de ocorrência de cepas de *Listeria* spp e *Listeria monocytogenes* nas amostras de carne bovina homogeneizada e salsichas tipo hot dog comercializadas a granel no Distrito Federal foram tratados no *software @Risk 5.0* para excel e possibilitou avaliar o risco dessas amostras estarem contaminadas por essas bactérias nessa região. Assumindo um intervalo de confiança de 95% pôde-se verificar a probabilidade mínima de contaminação da carne bovina homogeneizada comercializadas a granel conter bactérias do gênero *Listeria* spp. no Distrito Federal foi de 30,4%, e a probabilidade máxima de contaminação foi de 61,9% (Figura 04). Por outro lado, a probabilidade mínima desse tipo de alimento estar contaminado por *Listeria monocytogenes* no Distrito Federal, foi de 4,6% e a probabilidade máxima de contaminação foi de 26% (Figura 05).

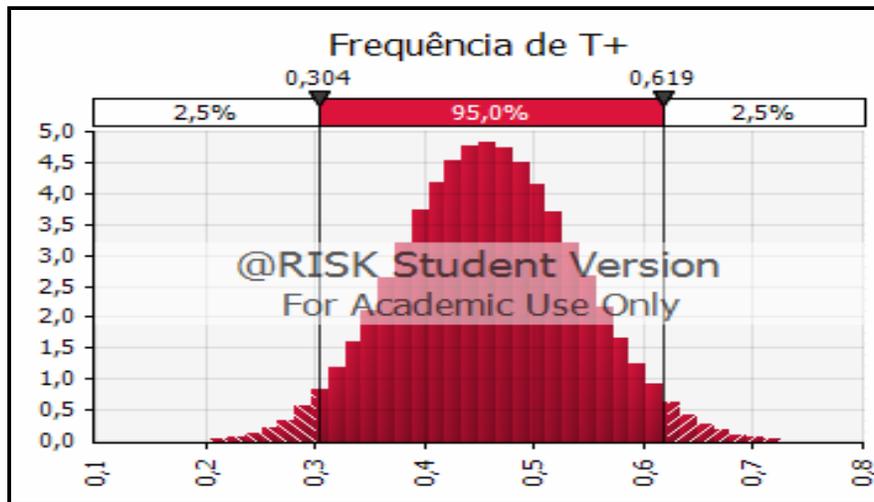


Figura 04. Análise de probabilidade de presença de *Listeria* spp. em carne bovina homogeneizada comercializada a granel no Distrito Federal.

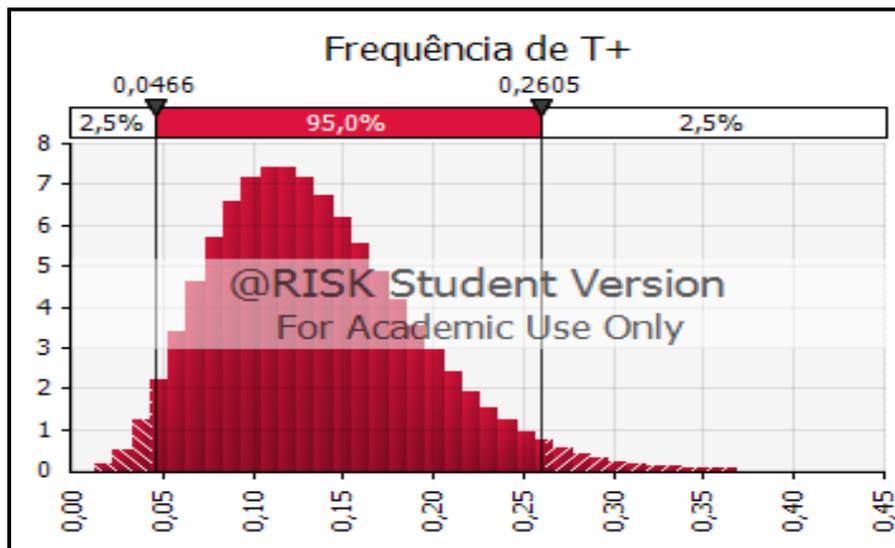


Figura 05. Análise de probabilidade de presença de *Listeria monocytogenes*. em carne bovina homogeneizada comercializada a granel no Distrito Federal.

Da mesma forma, assumindo um intervalo de confiança de 95%, pôde-se verificar a probabilidade mínima de contaminação de salsicha tipo hot dog a granel conter bactérias do gênero *Listeria* spp. no Distrito Federal foi de 14,8% e a probabilidade máxima de contaminação foi de 28,32% (Figura 06). Por

outro lado, a probabilidade mínima desse tipo de alimento estar contaminado, no Distrito Federal, por *Listeria monocytogenes* foi de 3,8% e a probabilidade máxima foi de 28,32% (Figura 07).

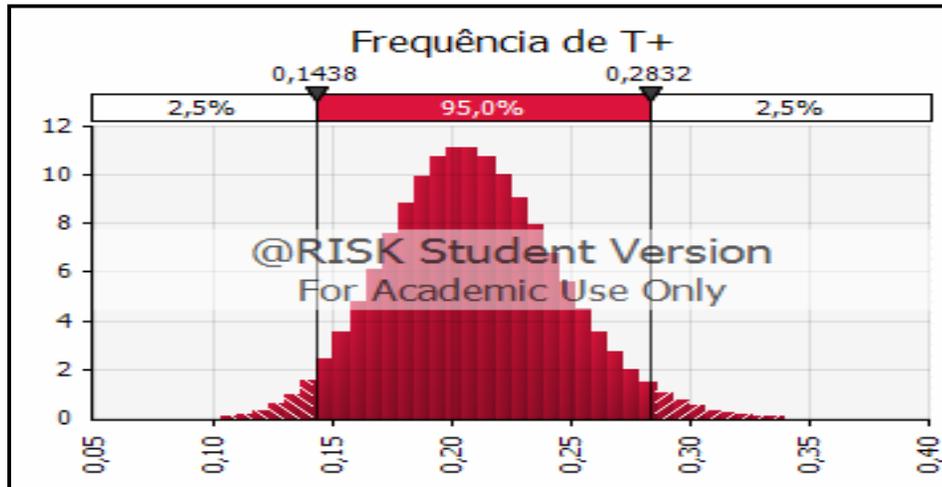


Figura 06. Análise da probabilidade de presença de *Listeria spp.* em salsichas tipo hot dog comercializada a granel no Distrito Federal.

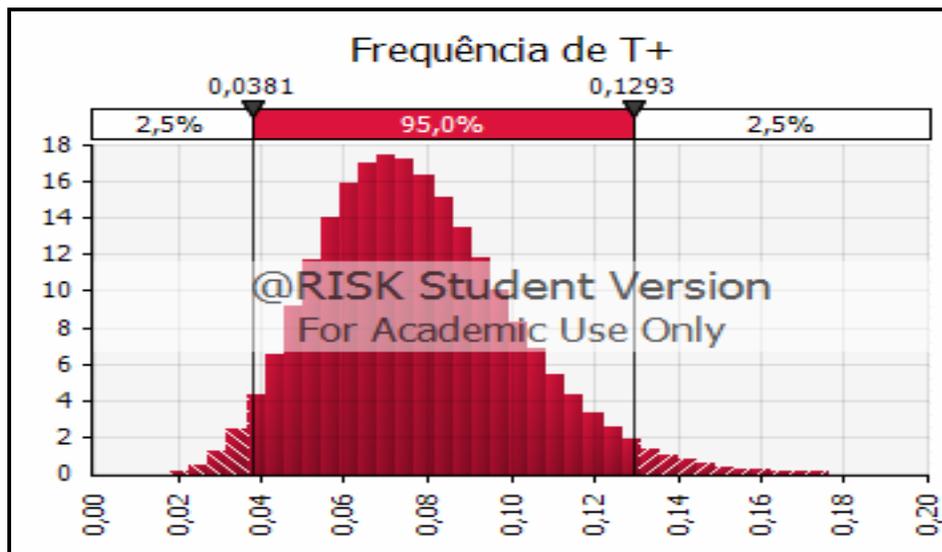


Figura 07. Análise da probabilidade de presença de *Listeria monocytogenes* em salsichas tipo hot dog comercializada a granel no Distrito Federal.

Segundo OPAS/OMS (2008), uma das qualidades importantes da avaliação de riscos microbiológicos é sua capacidade de quantificar os perigos através da cadeia de produção alimentar e associar diretamente a probabilidade da ocorrência de doenças transmitidas por alimentos.

A análise estatística realizada por esse estudo permitiu concluir que a carne bovina homogeneizada comercializada a granel no Distrito Federal tem maior probabilidade de estar contaminada quando comparada com as amostras de salsichas tipo hot dog a granel comercializadas na mesma região. A razão para isso pode ser o fato de a salsicha tipo hot dog ser cozida antes de serem comercializadas, e, a carne bovina homogeneizada, segue para a comercialização na forma crua, sem sofrer nenhum tratamento térmico. Entretanto, ambas as matrizes apresentaram ocorrência de *Listeria monocytogenes*, oferecendo risco à população que consome este tipo de alimento.

### **6.3 Extração e quantificação de DNA do controle positivo**

Para a extração de DNA total do controle positivo, a cepa foi inoculada em meio L e incubadas à 37°C, *overnight* à 200 rpm. Foi realizado a extração de 400µL deste inoculo e obteve-se para esta amostra a concentração média de aproximadamente 6 ng/µl de DNA total, conforme demonstrado na Figura 8. A extração de DNA total foi realizada por fenol/ clorofórmio (1:1) conforme protocolo descrito por Sambrook *et al.*, (2001).

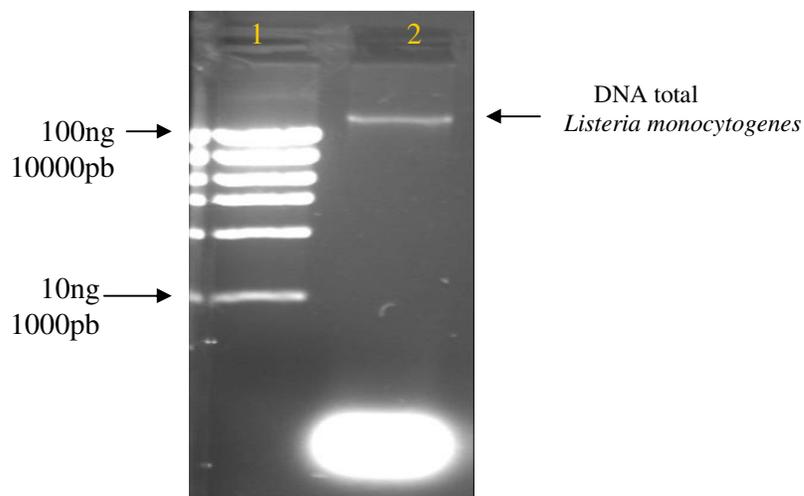


Figura 08. DNA total de cepa de *Listeria monocytogenes*. 1) Marcador High Mass Ladder Invitrogen®. 2) DNA Total do controle positivo após extração por fenol/clorofórmio (1:1) visualizado em gel de agarose a 0,8% com a adição de brometo de etídio 0,02% e submetido à ação da luz ultravioleta. Nesta quantificação o controle positivo apresentou concentração de 6 ng/μl.

#### 6.4 PCR e quantificação de *amplicon* do controle positivo (*listeria monocytogenes*)

Para a realização da reação em cadeia da polimerase e quantificação do *amplicon*, foram utilizados 4ng de DNA total do controle positivo como *template* para a obtenção do fragmento S1 (460bp) e S2 (890pb). Após a reação, obteve-se uma concentração de DNA *amplicon* de aproximadamente 20ng/μl para ambos os fragmentos S1 e S2 como demonstrado na Figura 09.

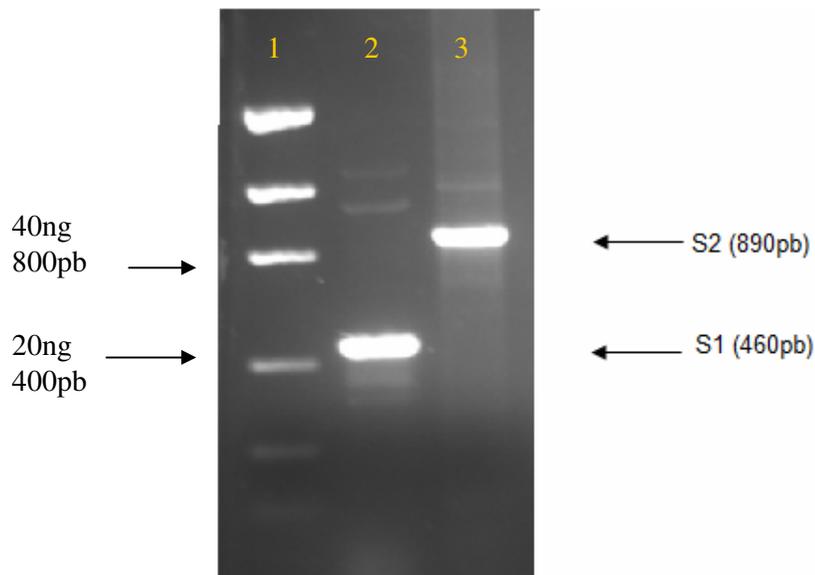


Figura 09. Reação da PCR em cepa de *Listeria monocytogenes* com *primers* S1 e S2 conforme descrito por Paillard *et al.*, (2003). 1) Marcador de massa molecular Low Mass Ladder Invitrogen®; 2) Produto de PCR (*amplicon*) S1 (460pb); 3) Produto de PCR (*amplicon*) S2 (890pb). Os *amplicons* S1 e S2 do controle positivo obtiveram concentração de aproximadamente 20ng/μl. O resultado da PCR foi visualizado em gel de agarose 1,5% com adição de 0,02% de brometo de etídio.

### 6.5 RFLP do controle positivo

Após a obtenção do *amplicon* S2 (890pb) do controle positivo, o mesmo foi submetido à análise polimórfica de restrição. A reação de digestão com as enzimas *XmnI* e *CfoI* foi realizada para confirmação de cepa de *Listeria monocytogenes* segundo Paillard *et al.*, (2003). O *amplicon* S2 (890pb) foi digerido com a enzima *XmnI* e gerou fragmentos de 770pb e 120pb conforme ilustrado na Figura 10. O *amplicon* S2 (890pb) foi digerido com a enzima *CfoI* e gerou fragmentos de 470pb, 170pb, 130pb e 120pb, confirmando assim a espécie *Listeria monocytogenes*, conforme ilustrado na Figura 11.

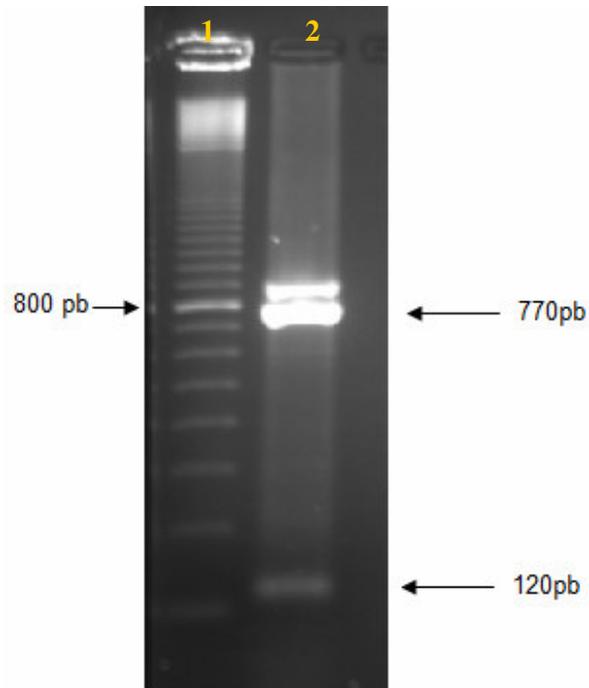


Figura 10. Visualização da análise polimórfica de restrição do produto de PCR (*amplicon*) S2 (890pb) do controle positivo. 1) Marcador de 100pb Invitrogen®. 2) Produto da digestão do *amplicon* S2 com a enzima *XmnI*. A digestão gerou fragmentos de DNA esperados para *L. monocytogenes* de 770pb e 120pb. A visualização desse perfil de restrição foi realizada em gel de agarose a 2% com adição de 0,02% de brometo de etídio e submetido à ação da luz ultra-violeta.

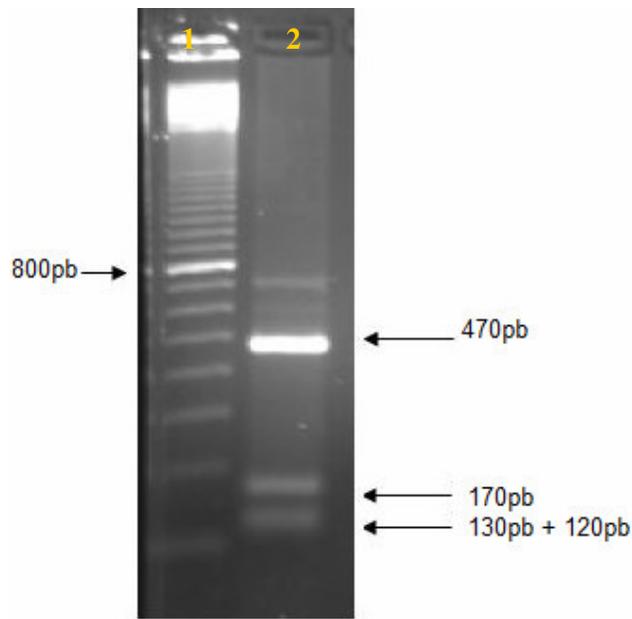


Figura 11. Análise de restrição com a enzima *CfoI* do produto (*amplicon*) de PCR S2 (890pb) do controle positivo. 1) Marcador de 100pb Invitrogen®. 2) Produto de digestão do *amplicon* S2 com a enzima *CfoI*. A digestão gerou fragmentos de 470pb, 170pb, 130pb e 120pb confirmando assim a espécie de *Listeria monocytogenes*. A visualização dessa digestão enzimática foi realizada em gel de agarose a 2% com adição de 0,02% de brometo de etídio e submetido à ação da luz ultra-violeta.

### 6.6 Extração e quantificação de DNA total de cepas de *Listeria* spp. isoladas de salsichas tipo hot dog a granel e de carne bovina homogeneizada a granel

A extração e quantificação de DNA total de cepas de *Listeria* spp. isoladas de salsichas tipo hot dog a granel e de carne bovina homogeneizada a granel foi realizada conforme procedimento descrito para o controle positivo. Após a extração de DNA total de 400µL dos inóculos em meio L, para todas as cepas, obteve-se concentração média aproximada de DNA total de 6 ng/µl, conforme demonstrado na Figura 8. A extração de DNA total foi realizada por fenol/clorofórmio (1:1) conforme protocolo descrito por Sambrook *et al.*, (2001). Este procedimento foi realizado com êxito em todas as 42 cepas de *Listeria* spp. isoladas dos dois tipos de alimentos de origem animal, sendo 26 cepas

isoladas de salsichas tipo hot dog a granel e 16 cepas isoladas de carne bovina homogeneizada a granel.

Em seu estudo, Paillard *et al.* (2003), também obteve êxito na forma de obtenção de DNA total em todas as 182 cepas de *Listeria* spp. testadas. Porém, este processo foi realizado por meio de fervura das cepas. Neste trabalho optou-se por realizar a extração de DNA total por meio do fenol/clorofórmio para se minimizar o risco de reações inespecíficas da PCR ou de falsos negativos devido ao excesso de proteínas, seguindo as recomendações Azevedo *et al.* (2003). A Figura 12 demonstra o resultado após extração de DNA total de três amostras de salsicha tipo hot dog.

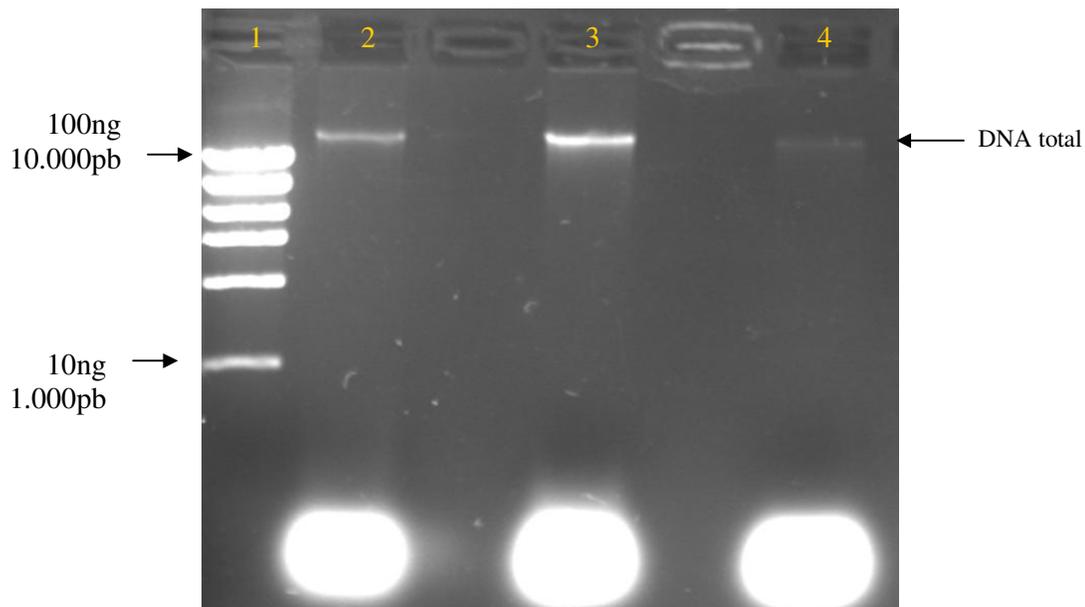


Figura 12. Extração e quantificação de DNA total de cepas de *Listeria* spp. isoladas de salsichas tipo hot dog a granel e carne homogeneizada a granel. 1) Marcador de massa molecular High Mass Invitrogen®; 2, 3 e 4) Confirmação da presença de DNA total em três amostras de cepas de *Listeria* spp. isoladas de salsichas tipo hot dog a granel. A visualização desse perfil foi realizada em gel de agarose a 0,8% com adição de 0,02% de brometo de etídio e submetido à ação da luz ultra-violeta. As concentrações de DNA obtidas foram de 6ng/  $\mu$ l, 8ng/  $\mu$ l e 04 ng/  $\mu$ l, respectivamente.

## 6.7 Realização da PCR das cepas de *Listeria* spp. isoladas de salsichas tipo hot dog e carne bovina homogeneizada

Para realizar a reação em cadeia da polimerase (PCR) das cepas de *Listeria* spp. previamente isoladas de salsichas tipo hot dog a granel e carne bovina homogeneizada a granel, foi seguido mesmo protocolo descrito para o controle positivo. A PCR foi realizada com êxito em todas as 43 cepas de *Listeria* spp. isoladas previamente dos dois tipos de alimentos, e proporcionou em todas as amostras a obtenção de fragmentos S1 (460pb) e S2 (890pb). Todos os fragmentos S1 (460pb) e S2 (890pb) foram quantificados através do uso do marcador Low Mass Invitrogen®. A concentração média aproximada desses produtos foi de 40ng/μl conforme demonstrado na Figura 13.

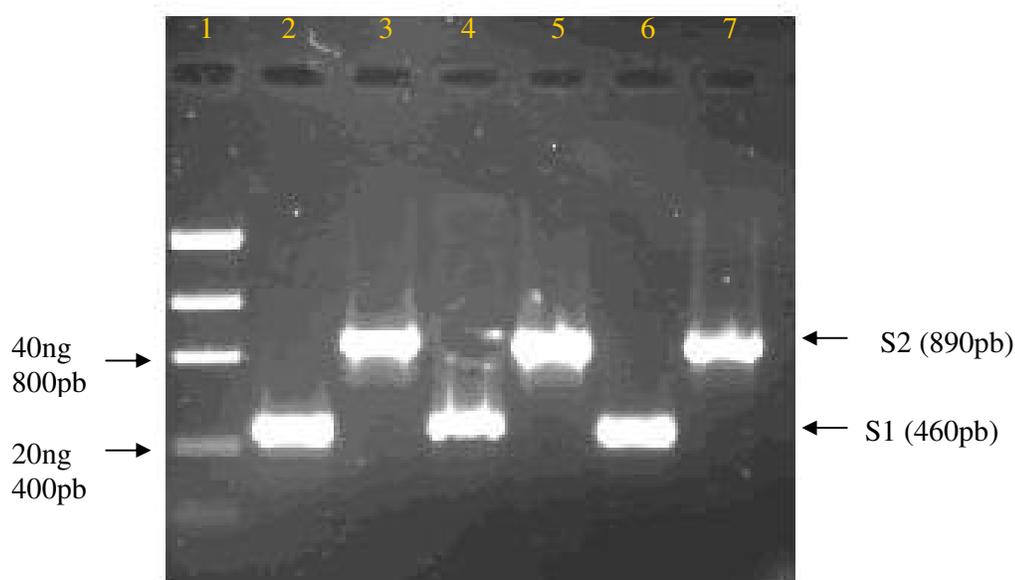


Figura 13. Resultado da PCR em três cepas de *Listeria* spp. isoladas de amostras de salsichas tipo hot dog a granel. 1) Marcador de massa molecular Low Mass Promega®; 2 e 3) Produtos de PCR, S1 (460pb) e S2 (890pb) respectivamente, de uma mesma cepa de *Listeria* spp. isoladas de salsicha tipo hot dog a granel. Idem em (4 e 5) e (6 e 7). Todos os produtos de PCR representados obtiveram concentração de DNA *amplicon* de aproximadamente 40ng/μl. A visualização desse perfil foi realizada em gel de agarose a 1,5% com adição de 0,02% de brometo de etídio e submetido à ação da luz ultra-violeta.

A reação da PCR com os primers descritos por Paillard *et al.* (2003) foram concluídas com êxito, a menos que se faça o sequenciamento de cada um deles, estes oligonucleotídeos não permitem diferenciar as espécies. Entretanto, nesta etapa a PCR confirmou o gênero *Listeria*. Vale ressaltar que as cepas utilizadas como *template* por aqueles autores foram isoladas de seis efluentes de estações de tratamento de água localizados na cidade Bordeaux, França. Os mesmos oligonucleotídeos funcionaram com as cepas oriundas de outra matriz, no caso salsicha tipo hot dog a granel e carne bovina homogeneizada comercializada no Distrito Federal, sugerindo a conservação do gene 23S rRNA.

Cocolin *et al.* (2002), em seu estudo, realizaram a PCR da proteína associada com virulência (p60) do gene *iap* em 48 cepas de *Listeria* spp. isoladas de diferentes tipos de alimento. Esses autores utilizaram cinco pares de *primers* específicos para cada uma de cinco espécies de *Listeria* spp. (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* e *L. seeligeri*) possibilitando a obtenção de *amplicons* com diferentes tamanhos entre essas espécies. Entretanto, devido à grande similaridade no tamanho desses *amplicons* obtidos entre as diferentes espécies de *Listeria*, a diferenciação só foi possível de ser visualizada através da análise do gradiente de desnaturação em gel de eletroforese (DGGE) na concentração de 8% de acrilamida-bisacrilamida com 20-40% de ureia-formamida.

Long *et al.* (2008), em seu estudo, desenvolveram e padronizaram a Q-PCR para detectar a presença e quantificar *Listeria monocytogenes*. O gene alvo selecionado para a detecção dessa bactéria foi o *hly*, que é responsável pela produção da listeriolisina O. Segundo os autores, além da rápida detecção, esse método permitiu a quantificação de *Listeria monocytogenes*, e, por isso, pode ser útil para verificar a presença desta bactéria tanto no diagnóstico clínico como no diagnóstico em alimentos.

## **6.8 Realização da RFLP-PCR das cepas de *Listeria* spp. isoladas de salsichas tipo hot dog e carne bovina homogeneizada**

A análise do polimorfismo dos fragmentos de PCR S1 (460bp) e S2 (890bp) por restrição foi realizada com a finalidade de identificar as espécies de

*Listeria* spp. presentes nas amostras de salsichas tipo hot dog a granel e carne bovina homogeneizada a granel previamente isoladas e identificadas por testes bioquímicos. As enzimas utilizadas neste estudo foram: *XmnI*, *CfoI*, *AluI* e *Clal* conforme estratégia descrita, adaptada de PAILLARD *et al.* (2003). O protocolo utilizado para realizar essas análises de restrição em todas as amostras desses dois tipos de alimento foi idêntico ao descrito para o controle positivo.

Na Figura 14, os *amplicons* S2 (890pb) de três cepas isoladas de amostras de salsichas tipo hot dog a granel foram submetidos individualmente à reação enzimática com a enzima *XmnI*, o que resultou em fragmentos de 770pb e 120pb, característicos das espécies *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri* ou *Listeria ivanovii*; e de 650pb, 130pb e 120pb no caso de detecção das espécies *Listeria innocua*, *Listeria grayi* e *Listeria Welshimeri*.

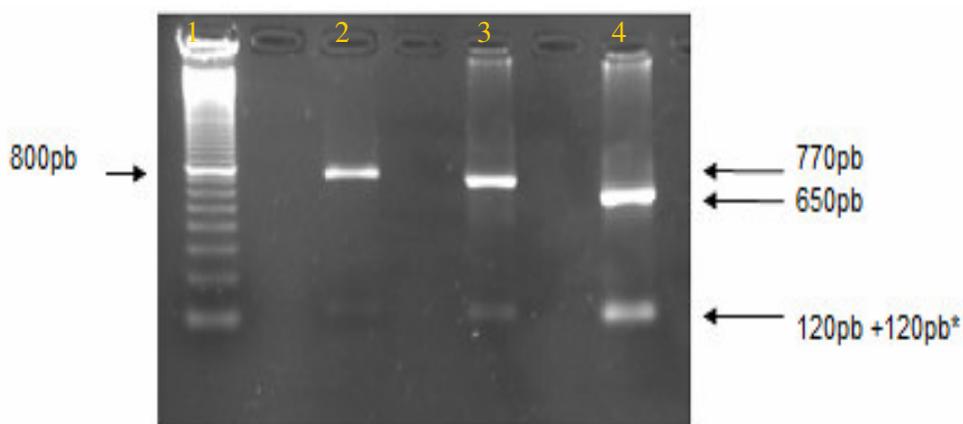


Figura 14. Análise de restrição com a enzima *XmnI* de três cepas de *Listeria* spp. isoladas de amostras de salsicha tipo hot dog a granel (2, 3 e 4). 1) Marcador de 100pb Invitrogen®. 2 e 3) Obtenção dos fragmentos de 770pb e 120pb, que é sugestivo de *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* ou *Listeria seeligeri*. 4) A obtenção dos fragmentos de 650pb, 130pb e 120pb que é sugestivo de *Listeria innocua*, *Listeria grayi* ou *Listeria welshimeri*. Visualização da digestão enzimática em gel de agarose 2% com adição de 0,02% de brometo de etídio e submetido à ação da luz ultra-violeta.

Após a análise de restrição com a enzima *XmnI*, o *amplicon* S2 (890pb) dessas três amostras foram submetidos individualmente a uma segunda reação enzimática, desta vez utilizando a enzima *CfoI* (Figura 15). A análise de

restrição desta reação enzimática demonstrou a presença de fragmentos de 470pb, 170pb, 130pb e 120pb nas três amostras; desta forma, as duas amostras que obtiveram fragmentos de 770pb e 120pb após digestão com a enzima *Xmnl* (2 e 3 da Figura 14), foram identificadas como *Listeria monocytogenes*. A amostra presente em 4 da Figura 15 foi submetida a uma nova reação de digestão enzimática para diferenciação da espécie envolvida.

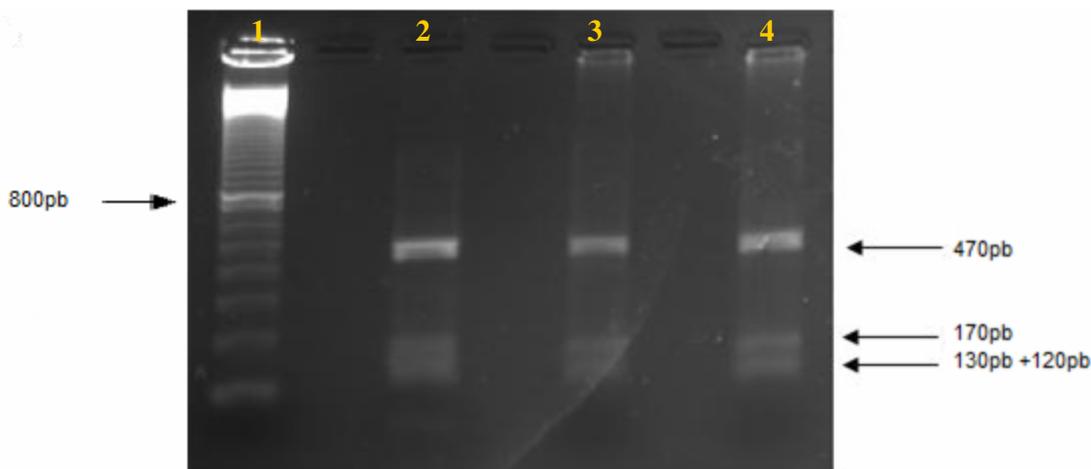


Figura 15. 1) Marcador 100 pb Invitrogen®. 2, 3, e 4) Análise de restrição com a enzima *CfoI* em três amostras de salsicha tipo hot dog a granel. 2 e 3) Os fragmentos de 470pb, 170pb, 170pb e 120pb confirma essas amostras como *Listeria monocytogenes*. 4) A obtenção desses fragmentos sugere que essa cepa seja *Listeria innocua* ou *Listeria welshimeri*. Para a confirmação, a amostra será submetida à análise de restrição com uso da enzima *AluI*. Estes fragmentos foram visualizados em gel de agarose 2% com adição de 0,02% de brometo de etídio e submetido à ação da luz ultra-violeta.

A cepa de *Listeria* spp. que ainda não havia sido identificada (4 da figura 15) foi submetida a uma nova reação enzimática, desta vez utilizando o amplicon S1 (460pb) com a enzima *AluI* (Figura 16) com a finalidade de identificar a espécie de *Listeria* spp. envolvida, presuntiva de ser *Listeria innocua* (330pb e 130pb) ou *Listeria welshimeri* (270pb, 190pb, 150pb e 120pb). Após a digestão enzimática dessa amostra obteve-se os fragmentos de 330pb e 130pb que caracterizaram a espécie *Listeria innocua*, conforme descrito por Paillard *et al.* (2003).

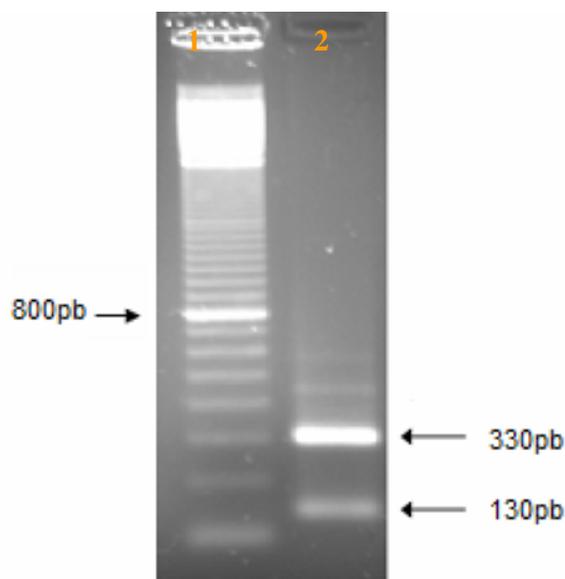


Figura 16. 1) Marcador de 100pb Invitrogen®. 2) Análise de restrição com a enzima *AluI* para efetuar a distinção entre *Listeria innocua* e *Listeria welshimeri* da amostra suspeita (4 da Figura 10). Os fragmentos de 460pb, 330pb e 130pb confirmam essa amostra como *Listeria innocua*. Estes fragmentos foram visualizados em gel de agarose 2% com adição de 0,02% de brometo de etídio e submetido à ação da luz ultra-violeta.

Neste estudo, a análise de restrição dos produtos de PCR S1 e S2 identificou a espécie de *Listeria* spp. em todas as amostras previamente isoladas de salsichas tipo hot dog a granel e carne bovina homogeneizada a granel comercializados no Distrito Federal. Todas as cepas isoladas das duas matrizes e submetidas às digestões enzimáticas, obtiveram fragmentos de DNA esperados para cada espécie de *Listeria* spp. presente na amostra, conforme estratégia desenvolvida por Paillard *et al.* (2003). Das 42 espécies de *Listeria* spp. isoladas dessas matrizes, 26 cepas foram isoladas de salsicha tipo hot dog a granel e 16 de carne bovina homogeneizada. Das 26 cepas isoladas de salsicha tipo hot dog a granel, 18 foram identificadas como *Listeria innocua* e 08 foram identificadas com *Listeria monocytogenes*. Das 16 cepas de *Listeria* spp. isoladas de amostras de carne bovina homogeneizada, 12 foram identificadas como *Listeria innocua* e 04 como *Listeria monocytogenes*. Todas as cepas de *Listeria* spp. identificadas pela RFLP em nosso estudo

apresentaram concordância com a identificação obtida pelo teste de identificação bioquímica realizada pelo kit comercial API®-Listeria.

Paillard *et al.* (2003) obtiveram discordância entre a identificação de cepas de *Listeria* spp. realizada com o API®-Listeria e a RFLP-PCR. Estes autores relataram em seu estudo que das 182 amostras de cepas de *Listeria* spp. isoladas e identificadas, 51 delas apresentaram discordância entre os dois métodos. Segundo estes autores, a maior parte dos erros de diagnóstico apresentados pelo método bioquímico do kit API® Listeria (22 cepas) eram provenientes de culturas de cepas de *Listeria innocua* em associação com *Listeria monocytogenes*. Para a identificação dessas cepas não identificadas, os autores realizaram então multiplex-PCR. Estes dados sugerem que a associação de colônias de *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes* ocorre com certa frequência, e, devido ao fato destas duas espécies possuírem características fenotípicas semelhantes, pode interferir no resultado da identificação da espécie de *Listeria* spp., principalmente se realizado por meio de testes de reações bioquímicas específicas.

Czajka *et al.* (1993) afirmam que a importância de se diferenciar as espécies *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* e outras espécies de *Listeria* spp. é estabelecer os reservatórios de cada espécie.

Pode ser que a concordância de 100% entre os testes de identificação bioquímica e a RFLP-PCR na identificação de espécies de *Listeria* spp. obtida neste estudo seja devido a um relativo número baixo de amostras testadas. Não se pode descartar a possibilidade de que ocorram conflitos na identificação de espécies de *Listeria* spp. caso um maior número de amostras sejam analisadas.

Alguns trabalhos na literatura científica internacional relatam métodos de diferenciação entre espécies de *Listeria* usando ferramentas da biologia molecular. Cocolin *et al.* (2002) em seu estudo realizaram a identificação de 48 cepas de *Listeria* spp. isoladas de diferentes tipos de alimento utilizando a PCR do gene que codifica a proteína (p60). Para realizar essa identificação, esses autores utilizaram cinco pares de *primers* específicos para cada uma de cinco espécies de *Listeria* spp. (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* e *L. seeligeri*) possibilitando a obtenção de *amplicons* com diferentes tamanhos entre essas cinco espécies. Entretanto, devido à grande

similaridade no tamanho desses *amplicons* obtidos entre as diferentes espécies de *Listeria*, a diferenciação só foi possível de ser visualizada através da análise do gradiente de desnaturação em gel de eletroforese (DGGE) na concentração de 8% de acrilamida-bisacrilamida com 20-40% de ureia-formamida. Esta técnica, além de laboriosa, não permitiu a identificação da *Listeria grayi*.

A metodologia descrita por Paillard *et al.* (2003) foi padronizada em cepas de *Listeria* spp. isoladas de efluentes de estação de tratamento na França; diferentemente das cepas utilizadas neste estudo, que foram isoladas de salsichas tipo hot dog e carne bovina homogeneizada. Apesar disso, nossos resultados apresentaram conformidade com os resultados obtidos por aqueles autores, demonstrando a natureza conservada do gene 23S rRNA dessas bactérias nas diferentes matrizes.

## 7. CONCLUSÃO

A presença de espécies de *Listeria* spp. nas amostras de salsicha tipo hot dog e carne bovina homogeneizada a granel representa condição de higiene deficiente em alguma etapa do processamento ou manipulação destes produtos.

A metodologia da RFLP-PCR para a identificação de espécies de *Listeria* spp. em cepas provenientes de amostras de salsichas tipo hot dog e carne bovina homogeneizada comercializados a granel no Distrito Federal foi rápida e eficiente e permitiu identificar todas as 42 amostras testadas. O tempo médio necessário para se identificar a espécie de *Listeria* spp., a partir de uma colônia pura isolada utilizando essa ferramenta molecular foi de aproximadamente 18 horas.

Por se tratar de uma doença de grande interesse na saúde pública, uma vez que possui alta taxa de letalidade, a biologia da *Listeria* spp. precisa ser melhor estudada para que ocorra maior controle dessa bactéria durante a linha de produção na indústria de produtos cárneos. Métodos rápidos e mais eficientes poderão auxiliar no aprimoramento do diagnóstico de microrganismos patogênicos nos alimentos, e, uma vez adotados pela indústria de alimentos, poderão contribuir para melhorar a qualidade e segurança dos seus produtos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUTIO,T.; HIELM, S.; MIETTINEN, M.;SJOBORG, A-M.; AARNISALO, K.; BJORKROTH, J.; MATTILA-SANDHOLM,T.; KORKEALA, H. Sources of *Listeria monocytogenes* Contamination in a Cold-Smoked Rainbow Trout Processing Plant Detected by Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing. **American Society for Microbiology**. v.65, n.1, p150-155, 1999.
- BEN-ENBAREK, P.K. Presence, Detection and Growth of *Listeria monocytogenes* in Seafoods. **International Journal of Food Microbiology**. v.23, p.17-34, 1994.
- BORGES, M.F.; SIQUEIRA, R.S.; BITTENCOURT, A.M.; VANETTI, M.C.D.; GOMIDE, L.A.M. Ocurrence of *Listeria monocytogenes* in Salami. **Revista de Microbiologia**. v.30, p.362-364, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. 2008. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões de Inspeção Industrial e Sanitária de produtos de Origem Animal.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12 de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos dos Alimentos.
- BROWN, T. A. **Clonagem Gênica e Análise de DNA**. 4ª edição. SÃO PAULO-ARTMED, cap.4, p. 63-94, 2003.
- BUCHRIESER, C. Biodiversity of the Species *Listeria monocytogenes* and the Genus *Listeria*. **Microbes and Infection**. v.9, p.1147-1155, 2007.

- CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**, n.75, p. 499-511, 2003.
- CEPEDA, J.A.; MILLAR, M.; SHERIDAN, E.A.; WARWICK, S.; RAFTERY, M.; BEAN, D.C.; WAREHAM, D.W. Listeriosis Due to Infection With Catalase-Negative Strain of *Listeria Monocytogenes*. **American Society for Microbiology**. v.44, n.5, p. 1917-1918, 2005.
- CHRISTIANSEN, J. K.; NIELSEN, J. S.; EBERSBACH, T.; VALENTIN-HANSEN, P.; SOGAARD-ANDERSEN, L.; KALLIPOLITIS, B. H. Identification of Small Hfq-Binding RNAs in *Listeria monocytogenes*. **RNA society**. v.12, p. 1383-1396, 2006.
- COCOLIN, L.; RANTSIOU, K.; IACUMIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. Direct Identification in Food Samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by Molecular Methods. **Applied and Environmental Microbiology**. v.68, n.12, 2002.
- COLAK, H.; HAMPIKYAN, H.; ULUSOY, B.; BINGOL, E. B. Presence of *Listeria monocytogenes* in Turkish Style Fermented Sausage (Sucuk). **Food Control**. v.18, p. 30-32, 2007.
- CZAJKA, J.; BSAT, N.; PIANI, M.; RUSS, W.; SULTANA, K.; WIEDMANN, M.; WHITAKER, R.; BATT, C. A. Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by 16S rRNA Genes and Intraspecies Discrimination of *Listeria monocytogenes* Strains by Random Amplified Polymorphic DNA Polymorphisms. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 59, n.1, p. 304-308, 1993.
- FAO. Report of the FAO Expert Consultation on the Trade Impact of *Listeria monocytogenes* in the Fish Products. **Rome: FAO**, p.34, 1999.

- FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes, a Food-Borne Pathogen*. **American Society for Microbiology**. v.55, n.3, p. 476-511, 1991.
- FRANCIOSA, G.; TARTARO, S.; NEERGAARD, W.; AURELI, P. Characterization of *Listeria monocytogenes* Strains Involved in Invasive and Noninvasive Listeriosis Outbreaks by PCR-Based Fingerprinting Techniques. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, n.4, p. 1793-1799, 2001.
- GEOFFROY, C; RAVENEAU, J; BERETTI, J.L. LECROISEY, A.; VAZQUEZ-BOLLAND, J.A.; ALOUF, J.E.; BERCHE, P.; Purification and Characterization of an Extracellular 29-Kilodalton Phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. **American Society for Microbiology**. v. 59, n.7, p. 2382-2388, 1991.
- GIL, J.I. **Manual de Inspeção Sanitária de Carnes. Aspectos Especiais**. 2ª Edição. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal. v.2, 2000.
- HAMDI, T. M.; NAIM, M.; MARTIN, P.; JACQUET, C. Identification and Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated in Raw Milk in the Region of Algiers (Algeria). **International Journal of Food Microbiology**. v.116, n.1, p.190-193, 2007.
- JALALI, M.; ABEDI, D. Prevalence of *Listeria* species in food products in Isfahan, Iran. **International Journal of Food Microbiology**. v.122, p.336-340, 2008.
- JALLEWAR, P.K.; KALOREY, D.R.; KURKURE, V.V.; PANDE, V.V.; BARBUDDHE, S.B. Genotypic Characterization of *Listeria spp.* Isolated from Fresh Water Fish. **International Journal of Food Microbiology**. v.09, p. 34-38, 2006.

- JAY, J. M.; Prevalence of *Listeria spp.* In Meat and Poultry Products. **Food Control**. v.07, n.04, p. 209-214, 1996.
- JERSEK, B.; GILOT, P.; GUBINA, M.; KLUN, N.; MEHLE, J.; TCHERNEVA, E.; RIJPENS, N.; HERMAN, L. Typing of *Listeria monocytogenes* Strains by Repetitive Element Sequence-Based PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v.37, p.103-109, 1999.
- KASNOWSKI, M.C. Isolamento, Identificação, Estudo Sorológico e Antimicrobiano em Corte de Carne Bovina (Alcatra) Inteira e Moída. Rio de Janeiro, RJ: UFF, 2004, 111p. Dissertação de Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5ª ed. Rio de Janeiro-MEDSI, cap.13, p.674-677, 2001.
- LACIAR, L.; VACA, R.; LOPRESTI, A. DNA Fingerprinting by ERIC-PCR for Comparing *Listeria spp.* Strains Isolated from Different Sources in San Luis, Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**. v.38, p.55-60, 2006.
- LECUIT, M. Human Listeriosis and Animal Models. **Microbes and Infeccion**. v.9, p.1216-1225, 2007.
- LONG, F.; ZHU, X.; ZHANG, Z.; SHI, X. Development of a Quantitative Polymerase Chain Reaction Method Using a Live Bacterium as Internal Control for the Detection of *Listeria monocytogenes*. **Diagnostic Microbiology and Infections Disease**. v.12, p.1-8, 2008.
- LOW, J.C.; DONACHIE, W. A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. **The Veterinary Journal**. v.153, p. 9-29, 1997.

- MANTILLA, S.P.S.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; SANTOS, E.B.;GOUVÊA, R. Importância da *Listeria monocytogenes* em Alimentos de Origem Animal. **Revista da FZVA**. v.14, n.1, p.180-192, 2007.
- MANTILLA, S.P.S.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; SANTOS, E.B.;GOUVÊA, R. Ocorrência de *Listeria* spp. em Amostras de Carne Bovina Moída Comercializadas no Município de Niterói, RJ, Brasil. Comunicado. **Ciência e Agrotecnologia**. v.31, n.4, p.1225-1230, 2007.
- McLAUHLIN, J. The Identification of *Listeria* Species. **International Journal of Food Microbiology**. v.38, p. 77-81, 1997.
- MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P.A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Different Food Products Commercialized in Portugal. **Food Microbiology**. v.21, p.213-216, 2004.
- NIGHTINGALE, K.K.; SCHUKKEN, Y.H.; NIGHTINGALE, C.R.; FORTES, E.D.; HO, A.J.; HER, Z.; GROHN, Y.T.; McDONOUGH, P.L.; WIEDMANN, M. Ecology and Transmission of *Listeria monocytogenes* Infecting Ruminants and in the Farm Environment. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n.8, p.4458-4467, 2004.
- OKTEN, A. B.; BAYRAM, G.; CEYLAN, A. E.;YENTUR, G. Prevalence of *Listeria Monocytogenes* in Some Turkish Foodstuffs. **Food Control**. v.29, n.1, p. 76-86, 2006.
- OPAS/OMS. Perspectiva Sobre a Análise de Risco na Segurança de Alimentos. Curso de Sensibilização. Rio de Janeiro: Área Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças. 160p, 2008.
- PAILLARD, D.; DUBOIS, V.; DURAN, R.; NATHIER, F.; GUITTET, C.; CAUMETTE, P.; QUENTIN, C. Rapid Identification of *Listeria* Species by Using Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified 23S

rRNA Gene Fragments. **Applied and Environmental Microbiology**. v.69, n.11, p. 6386-6392, 2003.

PARIZZI, S. Q. F., **Adesão Bacteriana em Superfície de Serviços de Alimentação Hospitalar Avaliada pela Microscopia de Epifluorescência**. Viçosa, MG: UFV, 1998, 57p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.

PETTINATI, N.N.; TELLES, E.O.; BALLIAN, S. C. *Listeria monocytogenes* in Hot Dog Sausages Obtained from Groceries Stores in the City of São Paulo – A Comparative and Retrospective Analysis of Human Listeriosis Isolates. **Veterinária e Zootecnia**. v.13, n.2, p.182-191, 2006.

PIMENTA, F. C.; FURLANETTO, S. M.; MAYER, L. W.; TIMENETSKY, J.; SANTOS, M. A. Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated From Foods. **Revista de Microbiologia**. v.30, p. 356-361, 1999.

PINTO, U. M.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, M.C.D. Detection of *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* in a Hospital Food Service. **Revista de Nutrição**. v.17, n.3, p. 319-326, 2004.

RODRIGUES, D. A.; FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T. Avaliação da Eficiência de Três Ágares Seletivos no Isolamento de *Listeria monocytogenes*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, p.87-92, 2003.

ROUSSEAU, S.; OLIER, M.; LEMAITRE, J.P.; PIVETEAU, P.; GUZZO, J. Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of *inlA* for Rapid Screening of *Listeria monocytogenes* Strains Deficient in the Ability to Invade Caco-2 Cells. **American Society for Microbiology**. v.70, n.4, p.2180-2185, 2004.

- SAHIN, M.; BEYTUT, E. Abortions in Sheep Due to *Listeria ivanovii* in the Kars Region. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**. v.30, p.503-506, 2006.
- SALLEN, B.; RAJOHARISON, A.; DESVARENNE, S.; QUINN, F.; MABILAT, C. Comparative Analysis of 16S and 23S rRNA Sequences of *Listeria* Species. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 46, n.3, p.669-674, 1996.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning – a Laboratory Manual**. 3a edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, N Y, v.1, 2001.
- SCARCELLI, E.; PIATTI, R.M. Patógenos Emergentes Relacionados à Contaminação de Alimentos de Origem Animal. **Instituto Biológico**. v.64, n.2, p.123-127, 2002.
- SHEN, Y.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; CRIPE, J.; CONWAY, W.; MENG, J.; HALL, G.; BHAGWAT, A.A. Isolation and Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolates from Ready-To-Eat Foods in Florida. **American Society for Microbiology**. v.72, n.7, p. 5073-5076, 2006.
- SIEGMAN-IGRA, Y.; LEVIN, R.; WEINBERGER, M.; GOLAN, Y.; SCHWARTZ, D.; SAMRA, Z.; KONIGSBERGER, H.; YINNON, A.; RAHAV, G.; KELLER, N. *Listeria monocytogenes* Infection in Israel and Review of Cases Worldwide. **Emerging Infectious Diseases**. v.8, n.3, p. 305-310, 2002.
- SILVA, L. J.; RESENDE, M. R.; ABREU, W. B.; AOKI, F. H.; BOCATTO, R. B.; BRANCHINNI, M. L.; GONÇALES Jr, F. L.; LIMA, J. N.; NOWAKONVSKI, A. V.; PAPAORDANOU, P. M.; PEDRO, R. J.; ROSSI, C. L. Listeriosis and AIDS: Case Report and Literature Review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.34, n.5, p. 475-478, 1992.

STUART, S.E., WELSHIMER, H. J. Taxonomic reexamination of *Listeria* Pirie and Transfer of *Listeria grayi* and *Listeria murray* to a New Genus. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.24, p.177-185, 1973.

SUÑEN, E.; ARISTIMUÑO, C.; FERNANDEZ-GALIAN, B. Activity of Smoke Wood Condensates Against *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in Vacuum-Packaged, Cold-Smoked Rainbow Trout Stored at 4°C. **Food Research International**. v.36, n.2, p. 111-116, 2002.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The Epidemiology of Human Listeriosis. **Microbes and Infection**. v.9, p. 1236-1243, 2007.

VÁSQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, B.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. **Clinical Microbiology Reviews**. v.14, n.3, p. 584-640, 2001.