

Nadia David Peres

**DETECÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM
LEITE: SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA TÉCNICA DE
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Minas Gerais, Escola de
Veterinária, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Medicina
Veterinária.**

**Área de concentração: Tecnologia e
Inspeção de Produtos de Origem Animal**

**Orientadora: Mônica Maria Oliveira Pinho
Cerqueira**

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2007**

P437d Peres, Nadia David, 1979-
Detecção de *Listeria monocytogenes* em leite: sensibilidade e especificidade da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) / Nadia David Peres. – 2007.
43 p. : il.

Orientadora: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Leite – Análise – Teses. 2. *Listeria* – Identificação – Teses. 3. Reação em cadeia da polimerase -Teses. I. Cerqueira, Mônica Maria Oliveira Pinho. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 637

Dissertação defendida e aprovada em 2 de março de 2007 pela Comissão Examinadora constituída por:

Prfa. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Orientadora

Dra. Carla Christine Lange

Prof. Marcelo Resende de Souza

Aos meus queridos pais e a Deus

AGRADECIMENTOS

À professora Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira pela orientação, inspiração e amizade.

Aos professores Marcelo Resende, Cláudia Moraes e Mônica Leite por terem despertado em mim o interesse nessa área, pelo apoio e dicas.

Aos professores de saneamento Israel e Paulinho pela ajuda.

À Emília, pessoa que muito ajudou em todos os sentidos, obrigada por abrir as portas de sua casa e por todos os momentos em Juiz de Fora. Agradeço também à Dona Lúcia e a Moara pelo acolhimento.

Ao Ricardo e Paula pelo companheirismo, amizade, noites de estudos, fins de semana na EMBRAPA e por serem minha família durante a realização do experimento.

À Marcela e Débora por colaborarem em momentos difíceis e decisivos sempre com muita alegria.

Ao John, Marcinha e Ded pela simpatia.

Aos estagiários Vitor, Léo, Shao-lin, Liana, Abiah, Alessandra, Carol e Sabrina pela ajuda no experimento.

À Jasmin, Priscila e Érika por tornarem mais divertidos meus dias em Juiz de Fora.

Ao Marcos e Arnaldo do laboratório de Microbiologia do Leite/EMBRAPA por tudo que me ensinaram.

À Dra. Cida, Dra. Edna e ao Dr. Renaldi, muito obrigada pelo excelente projeto e pelo apoio.

À Crisolita, à FUNED e à Universidade Federal de Viçosa pelas amostras.

Ao Dr. Wladimir da Silva Padilha – Laboratório de Microbiologia de Alimentos – e à Universidade Federal de Pelotas pelas amostras cedidas.

Ao Instituto de Laticínio Cândido Tostes pelas amostras de leite fornecidas.

À EMBRAPA Gado de Leite pelo financiamento do projeto e oportunidade de estágio.

À Fundação Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa fornecida.

Ao IMA e ao LANAGRO-MG por permitirem a conclusão do mestrado.

Aos meus pais pelo apoio financeiro e emocional.

À Dra. Carla, pela paciência, ensinamentos, cobranças, orientação, ajuda e principalmente pela maneira que passou seus conhecimentos.

A Deus, sempre, por tudo...

*A adversidade desperta em nós capacidades que, em circunstâncias favoráveis, teriam
ficado adormecidas.
Horácio*

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. HISTÓRICO.....	14
2.2. O GÊNERO <i>Listeria</i>	15
2.3. LISTERIOSE.....	15
2.4. MECANISMOS DE INFECÇÃO.....	16
2.5. SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA TÉRMICA	17
2.6. ALGUNS SURTOS E OCORRÊNCIAS EM ALIMENTOS.....	17
2.7. MÉTODOS DE DETECÇÃO.....	18
3. OBJETIVOS	21
3.1. OBJETIVO GERAL	21
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. AMOSTRAS DE BACTÉRIAS.....	22
4.2. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS AMOSTRAS DE BACTÉRIA	22
4.2.1. Coloração de Gram.....	22
4.2.2. Tipo de hemólise.....	22
4.2.3. Teste de catalase.....	23
4.2.4. Motilidade no meio SIM.....	23
4.2.5. Teste do vermelho de Metila (VM).....	23
4.2.6. Teste de Voges-Proskauer (VP).....	23
4.2.7. Teste de CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peterson).....	24
4.2.8. Teste de oxidase.....	24
4.2.9. Hidrólise da esculina.....	24
4.2.10. Hidrólise do hipurato de sódio.....	24
4.2.11. Formação de ácidos a partir de carboidratos.....	24
4.2.12. Redução do nitrato.....	25
4.3. EXTRAÇÃO DE DNA DAS CULTURAS BACTERIANAS.....	25
4.3.1. Extração utilizando fenol e clorofórmio (Jersek et al., 1996).....	25
4.3.2. Método de lise térmica.....	26
4.3.3. Método de lise térmica diretamente da colônia.....	26
4.4. QUANTIFICAÇÃO DE DNA.....	26
4.5. PADRONIZAÇÃO DA PCR.....	26
4.5.1. Oligonucleotídeos iniciadores.....	26
4.5.2. PCR.....	26
4.5.3. Eletroforese em gel de agarose.....	27
4.6. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA PCR	
PARA <i>Listeria monocytogenes</i>	27
4.6.1. Avaliação da especificidade.....	27

4.6.2	Avaliação da sensibilidade.....	28
4.6.2.1	Determinação da concentração celular de um cultivo de <i>Listeria monocytogenes</i>	28
4.6.2.2	Determinação da sensibilidade da PCR em detectar <i>Listeria monocytogenes</i> em leite esterilizado a 110°/10 minutos.....	28
4.6.2.3	Determinação da sensibilidade da PCR em detectar <i>Listeria monocytogenes</i> em leite cru com baixa contaminação microbiana inicial e em leite cru com alta contaminação microbiana inicial.....	29
4.7	COMPARAÇÃO DA PCR COM O MÉTODO CONVENCIONAL.....	29
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS.....	29
5.2	PADRONIZAÇÃO DA PCR.....	30
5.3	DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA PCR EM DETECTAR <i>Listeria monocytogenes</i> EM LEITE ESTERILIZADO A 110°/10 MINUTOS.....	32
5.4	DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA PCR EM DETECTAR <i>L. monocytogenes</i> EM LEITE CRU COM BAIXA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA INICIAL.....	34
5.5	DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA PCR EM DETECTAR <i>L. monocytogenes</i> EM LEITE CRU COM ALTA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA INICIAL.....	36
6.	CONCLUSÕES	39
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Agentes seletivos e indicadores em alguns meios para detectar <i>Listeria monocytogenes</i>	20
Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR para identificação de <i>Listeria monocytogenes</i>	26
Tabela 3 - Caracterização bioquímica e amplificação por PCR de amostras de <i>Listeria</i> spp. isoladas do ambiente, de queijo e de produtos cárneos, e de amostras-padrão de <i>Listeria</i> spp.....	30
Tabela 4 - Comparação entre os métodos Convencional e PCR na detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> inoculada em leite estéril.....	33
Tabela 5 - Concentração de DNA bacteriano total obtido por extração de DNA utilizando fenol-clorofórmio após 24 e 48 horas de incubação em caldo de enriquecimento (LEB).....	33
Tabela 6 - Comparação dos métodos Convencional e PCR na detecção de <i>L. monocytogenes</i> experimentalmente inoculada em leite cru com baixa população microbiana, submetido a diferentes níveis de contaminação.....	35
Tabela 7 - Comparação dos métodos Convencional e PCR na detecção de <i>L. monocytogenes</i> inoculada em leite cru com alta contaminação microbiana, após etapa de enriquecimento seletivo.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Isolamento e identificação de <i>Listeria</i> spp. e <i>Listeria monocytogenes</i> em amostra de alimentos e do ambiente.....	19
Figura 2	Fluxograma de comparação dos métodos de PCR e convencional para detecção de <i>L. monocytogenes</i>	28
Figura 3	Reação de PCR <i>multiplex</i> com os oligonucleotídeos LMA/LMB e IAP1/IAP2. Canaleta 1: <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117; canaleta 2: <i>Streptococcus uberis</i> ; canaletas 3 e 5: <i>Streptococcus agalactiae</i> , canaleta 4: marcador de peso molecular de 100 pb; canaletas 6 e 7: <i>Staphylococcus aureus</i> ; canaleta 8: controle negativo.....	31
Figura 4	PCR com os oligonucleotídeos LM1/LM2. Canaleta 1: <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117; canaleta 2: <i>L. monocytogenes</i> ; canaleta 3: <i>L. innocua</i> IAL 1984; canaleta 4: <i>L. ivanovii</i> IAL 1983; canaleta 5: marcador de peso molecular de 100 pb; canaleta 6: <i>L. seeligeri</i> IAL 1985; canaleta 7: <i>L. welshimeri</i> ; canaleta 8: controle negativo da reação de PCR.....	32
Figura 5	PCR com os oligonucleotídeos LM1/LM2 após a etapa de enriquecimento a 30°C/48 h, com diferentes diluições de <i>L.monocytogenes</i> . Canaletas 1,2 e 3: extração de DNA por lise térmica do leite contaminado inicialmente com 48 UFC/ml; 4, 5 e 6: extração de DNA por lise térmica do leite contaminado inicialmente com 8 UFC/ml; 7 e 24; marcador de peso molecular (100 pb); 8, 9 e 10: extração de DNA por lise térmica do leite contaminado inicialmente com 1 UFC/ml; 11 e 25: controles positivos; 12 a 21: extração de DNA por lise térmica do leite inoculado com diluições onde não foram observado crescimento bacteriano no petrifilm; 22: controle negativo não inoculado; 23: controle negativo da reação de PCR; 26, 27 e 28: extração de DNA utilizando fenol-clorofórmio do leite contaminado inicialmente com 48 UFC/ml; 29, 30 e 31: extração de DNA utilizando fenol-clorofórmio do leite contaminado inicialmente com 8 UFC/ml; 32,33 e 34: extração de DNA utilizando fenol-clorofórmio do leite contaminado inicialmente com 1 UFC/ml; 15 e 35 vazio.....	34
Figura 6	PCR realizado com DNA extraído diretamente de colônias suspeitas crescidas nas placas de TSYEA. Canaletas 1,2 e 3: contaminação inicial de 45 UFC/ml; 4-7, 9-13: contaminação inicial de 6 UFC/ml; 14: controle positivo da reação; 8: marcador de peso molecular (100 pb).....	35
Figura 7	PCR com os oligonucleotídeos LM1/LM2 após a etapa de enriquecimento a 30°C/48 h com diferentes diluições de <i>L.monocytogenes</i> extraídos pelo método utilizando fenol-clorofórmio e reação de PCR realizada com DNA extraído diretamente de colônias suspeitas. Canaletas 1 a 9: extração de DNA do leite contaminado com número incontável de <i>L. monocytogenes</i> ; 7 e 24: marcador de peso molecular (100 pb); 10 e 11: extração de DNA do leite contaminado com 70 UFC/ml; 12 e 13: extração de DNA do leite contaminado com 8 UFC/ml; 14 e 25: controles positivos; 15 e 35: vazios; 16 ao 23: extração de DNA do leite sem contaminação inicial; 26 e 27: controles negativos; 28 a 32: extração de DNA direto da colônia/contaminação inicial incontável; 33 e 34: extração de DNA direto da colônia com contaminação inicial de 70 UFC/ml.....	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
API	Application Programming Interface
BHI	Brain Heart Infusion
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAMP	Christie, Atkins e Munch-Peterson
CBT	Contagem Bacteriana Total
CDC	Centro de Prevenção e Controle de Doenças
EDTA	Sal do Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
HCLA	Ágar Hemolítico Ceftazidima-cloreto
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IAP	Invasion Associated Protein
IDF	International Dairy Federation
LEB	Listeria Enrichement Broach
LPM	Lítio-feniletanol-moxalactam
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
RAPD-PCR	Análise do polimorfismo de fragmentos de DNA amplificados ao acaso
RT-PCR	Reação da Cadeia em Polimerase em Tempo Real
SSC	0,15 mol/l NaCl, 0,015 mol/l citrato de sódio
TE	Tris-EDTA
TSA	Trypticase Soy Agar
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
VM	Vermelho de Metila
VP	Voges-Proskauer

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi detectar *Listeria monocytogenes* inoculada em leite, após um período de enriquecimento seletivo, por meio da técnica de PCR. Foi feita a padronização de uma PCR utilizando os oligonucleotídeos LM1/LM2 e de uma PCR *multiplex* com os oligonucleotídeos IAP1/IAP2 e LMA/LMB. *Listeria monocytogenes* foi inoculada em várias concentrações em leite esterilizado desnatado e em leite cru integral com dois níveis diferentes de contaminação. A PCR padronizada foi aplicada para identificar a bactéria inoculada experimentalmente e foi comparada com o método convencional de detecção de *L. monocytogenes*. Foram comparados, também, os métodos de extração de DNA utilizando fenol-clorofórmio e por lise térmica, a partir de um caldo de cultura e diretamente da colônia suspeita. Somente foi possível identificar *L. monocytogenes* por PCR no leite esterilizado desnatado, após 48 horas de enriquecimento em meio seletivo (LEB). Neste caso, a sensibilidade do teste foi de 1 UFC/ml de leite, a mesma sensibilidade da metodologia convencional. Quando inoculada em leite cru integral com contaminação bacteriana, *L. monocytogenes* só foi detectada pela metodologia convencional, com uma sensibilidade de até 2 UFC/ml (leite com baixa contaminação). Foi possível reduzir o tempo de identificação de *L. monocytogenes*, substituindo os testes fenotípicos de identificação pela PCR padronizada, utilizando DNA bacteriano extraído pelo método de lise térmica, diretamente da colônia suspeita.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, PCR, detecção, leite

ABSTRACT

The aim of this work was to detect *Listeria monocytogenes* added in milk, after selective enrichment period, by PCR technique. A PCR technique using the primers LM1/LM2 and a multiplex PCR with IAP1/IAP2 e LMA/LMB was standardized. The conventional method of *L. monocytogenes* detection was compared from milk samples with different bacterial count added with various *L. monocytogenes* concentrations. The DNA extraction methods using phenol-chloroform and thermal split were compared. The DNA extraction and the conventional methods showed the same result in detecting the bacterium in samples of sterilized milk. In milk samples with any initial contamination, the conventional methodology was sensitive and PCR from enrichment broth can not detect *L. monocytogenes* added, independently of the extraction method used. The identification time of *L. monocytogenes* decreased using the DNA extraction by the strain split method using suspect colonies that grew in Oxford and PALCAM, in substitution of identification phenotypes tests.

Key words: *Listeria monocytogenes*, PCR, detection, milk

1 INTRODUÇÃO

Algumas doenças de origem alimentar são bem conhecidas, mas estão sendo consideradas emergentes porque, recentemente, se tornaram mais comuns. *Listeria monocytogenes* é um microrganismo emergente porque foi recente o reconhecimento do papel do alimento na sua transmissão ao homem.

Listeriose está mais frequentemente associada com o consumo de alimentos contaminados, como queijos macios e carnes processadas, que são conservados sob refrigeração, pois o microrganismo envolvido é capaz de crescer em baixas temperaturas.

Durante o processo de produção, elaboração, transporte, armazenamento e distribuição, qualquer alimento pode se contaminar por substâncias tóxicas, bactérias, vírus e parasitos. O leite, devido ao pH próximo ao neutro e sua variedade e quantidade de nutrientes, constitui um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de diversos microrganismos. Os cuidados higiênicos para evitar contaminação devem ser iniciados na ordenha e continuados até o momento de se consumir o produto. O queijo é considerado um veículo freqüente de patógenos de origem alimentar e, em especial, os queijos frescos artesanais têm sido muito relatados em surtos de infecção e intoxicação alimentar. Dentre esses queijos artesanais, destaca-se o queijo de coalho por ser comumente elaborado a partir de leite cru.

Doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados causam impacto à saúde pública e à economia mundial. O Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) estima que doenças de origem alimentar são responsáveis por 76 milhões de casos por ano nos Estados Unidos, resultando em 325.000 hospitalizações e

5.000 mortes (Food..., 2002). A listeriose se tornou uma preocupação no Brasil e no mundo a partir da década de 80, quando ocorreram surtos, sobretudo na América do Norte.

A emergência da listeriose resulta de interações complexas entre vários fatores, refletindo em mudanças no padrão social. Esses fatores incluem: progressos médicos e mudanças geográficas, assim como o aumento do número de pessoas imunossuprimidas e idosas; mudança na produção primária de alimentos (produção em larga escala), modificações nos processos tecnológicos, desenvolvimento da indústria agrícola e de sistemas de estocagem sob refrigeração, além de mudanças nos hábitos alimentares, como aumento da demanda de consumo por alimentos prontos, congelados ou refrigerados, que possam ser preparados rapidamente.

Considerando a importância desta doença transmitida pelo consumo de produtos de origem animal, este trabalho se propôs a padronizar uma PCR (*Polimerase Chain Reaction*) para identificar *Listeria monocytogenes* e avaliar a sensibilidade e especificidade da reação na identificação deste patógeno inoculado experimentalmente em leite.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

Listeria monocytogenes foi observada em feridas de pacientes, provavelmente em 1891. A primeira observação sobre *Listeria* em animais provavelmente coube a Hülphers em 1911, que isolou uma bactéria de focos necróticos em fígado de coelho, denominada de *Bacillus hepatis* (Seeliger, 1984).

A primeira descrição de um bastonete Gram-positivo foi feita por Murray et al. em 1926. Eles descreveram uma infecção espontânea que ocorreu entre os coelhos e cobaios de

laboratório no biotério da Universidade de Cambridge e denominaram o agente de *Bacterium monocytogenes*, em virtude de a infecção ser caracterizada por uma monocitose (Salamano et al., 2005). No ano seguinte, Pirie (1927) estudando uma epizootia em roedores na África do Sul, isolou de fígado uma bactéria que recebeu a denominação de *Listerella hepatolytica*, em homenagem ao cientista e cirurgião britânico lorde Joseph Lister (1827-1912), que estudou infecção séptica pós-operatória. Finalmente, em 1940, o microrganismo foi caracterizado de forma definitiva como *Listeria monocytogenes* (Gray e Killinger 1966; Oliveira, 1993; Hofer e Reis, 2005;).

2.2 O GÊNERO *Listeria*

Espécies de *Listeria* estão distribuídas no ambiente e podem ser isoladas do solo, plantas, vegetação em decomposição e silagem (Quinn et al., 1994). Existem seis espécies descritas, que podem ser divididas em dois grupos: hemolíticas e não-hemolíticas. No primeiro grupo estão: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* (subespécies *ivanovii* e *londoniensis*) e *L. seeligeri*. As não hemolíticas (segundo grupo) são *L. grayi*, *L. innocua* e *L. welshimeri* (Bille et al., 2003).

Listeria monocytogenes é uma bactéria patogênica, ubiqüitária, microaeróbia, Gram positivo que causa infecções sérias em indivíduos imunossuprimidos e em mulheres gestantes (Almeida e Almeida, 2003). Ela é psicrotrófica, não esporulada, se caracteriza morfológicamente por ser bastonete curto e crescer rapidamente em culturas e em tecidos animais. A *L. monocytogenes* é catalase positiva, oxidase negativa, hidrolisa a esculina, tolera até 10% de cloreto de sódio e cresce em pH variando entre 4,1 e 9,6 (Quinn et al., 1994; Almeida e Almeida, 2003). Possui ainda, a capacidade de formar biofilme (Gandhi e Chikindas, 2007).

Listeria ivanovii e *L. monocytogenes* podem causar doenças em animais e *L. monocytogenes* tem sido muito incriminada como causadora de doença no homem (Quinn et al., 1994). Segundo Farber e Peterkin (1991), 95% dos surtos de listeriose humana de origem alimentar foram causados por *L. monocytogenes* sorotipos 1/2a e 4b.

2.3 LISTERIOSE

Listeriose é uma doença alimentar atípica devido a sua gravidade e por não possuir natureza entérica, se manifestando na forma de meningite, septicemia e aborto. Grande número de acometidos vai a óbito (20-30%) e o período de incubação varia de 3 a 70 dias com média de 3 semanas (Doyle et al., 1997).

A sintomatologia causada pela listeriose em humanos inclui uma síndrome parecida com a influenza em mulheres grávidas. *Listeria monocytogenes* pode infectar o feto e causar aborto ou nascimento prematuro. Em três casos de meningite por *L. monocytogenes*, relatados no Distrito Federal, os pacientes apresentaram febre e, dois deles, quadro de convulsão, cefaléia e vômito (Hofer et al., 1998). A manifestação neurológica da doença pode ocorrer nos neonatos e em adultos, principalmente nos imunossuprimidos. Médicos veterinários e magarefes podem adquirir infecção primária cutânea e, depois, a forma generalizada (Quinn et al., 1994).

De um total de 3.112 amostras de *Listeria* spp. provenientes de regiões diferentes do Brasil, e que foram estocadas durante vinte e seis anos consecutivos (1971-1997), de diferentes origens (solo, efluente de indústria de embutidos, carcaças de frango, carnes), Hofer et al. (2000) identificaram *Listeria innocua* como a mais prevalente (72,9%). A porcentagem de *L. monocytogenes* encontrada foi de 24,8% e o sorotipo 4b foi o mais presente (45,4%). Neste mesmo estudo, também foi constatado

que o sorotipo 4b predomina em amostras de humanos e de carnes; o sorotipo 4a em amostras de animais, principalmente de vacas saudáveis; o sorotipo 1/2a em produtos lácteos e 1/2b em amostras do ambiente.

Alguns relatos sobre a ocorrência de listeriose no homem têm sido feitos no Brasil. No período de abril a dezembro de 1985 foram observados cinco casos de listeriose em transplantados renais em um mesmo hospital em São Paulo. A maior prevalência, nesses casos, foi de *L. monocytogenes* do sorotipo 4b (Hofer et al., 1999). Também no Estado de São Paulo foram relatados dois casos de peritonite bacteriana espontânea por *L. monocytogenes* em pacientes com cirrose (Toyoshima et al., 2006).

Em um estudo retrospectivo realizado no setor de patologia de um hospital-escola de Porto Alegre no ano 2000, foram examinados, utilizando a técnica de imunohistoquímica, 254 blocos de parafina de placentas provenientes de aborto, parto prematuro e nascimento a termo. Dessas placentas, 148 apresentaram alterações quando examinadas pela técnica de hematoxilina e eosina, indicando possível presença de *L. monocytogenes*. Dessas 148 placentas analisadas, 33,7% foram positivas para a bactéria pesquisada, sendo o microrganismo isolado em placentas de todos os trimestres gestacionais e provenientes de pacientes de várias idades (Schwab e Edelweiss, 2003).

2.4 MECANISMOS DE INFECÇÃO

Esta bactéria é um parasita intracelular facultativo, que invade uma extensa variedade de células devido à capacidade de escapar da membrana de fagossomos, para se reproduzir intracelularmente no hospedeiro. Após a replicação, *L. monocytogenes* se difunde diretamente nas células adjacentes através de um mecanismo

de motilidade, baseado na polimerização da actina da célula hospedeira (Almeida e Almeida, 2003).

A associação da listeriose com o consumo de leite pasteurizado reforça a hipótese de que a ingestão do microrganismo é um dos mecanismos de infecção (Fleming et al., 1985). Entretanto, Jersek et al. (1999) sugeriram que uma minoria de *L. monocytogenes* presente nos alimentos pode causar infecção nos homens e nos animais. *Listeria* pode ultrapassar a barreira epitelial e intestinal e se instalar e multiplicar nos hepatócitos e macrófagos do baço, com o auxílio de uma hemolisina chamada listeriosina O (Quinn et al., 1994). A listeriolisina O é a responsável pelo aparecimento da zona de beta-hemólise, observada quando *L. monocytogenes* é inoculada em ágar-sangue, e é codificada pelo gene *hly*. Ela permite que a bactéria escape ao processo de fagocitose (Salysers e Whitt, 1994). Uma das proteínas associadas à invasão celular é a p60, que é codificada pelo gene chamado *iap*, de “*invasion associated protein*” (Rocourt e Cossart, 1997). Uma rota alternativa pode ser a das superfícies das mucosas ao sistema nervoso central, via bainha do nervo periférico, terminando no nervo trigêmeo (Quinn et al., 1994).

O crescimento no ambiente reduz a produção dos fatores de virulência, pelo fato desses não serem necessários à sobrevivência. Mas se introduzidos na intimidade do hospedeiro susceptível, ocorre rápida expressão dos genes de virulência. O domínio sobre o mecanismo de ação desses fatores fornece subsídios úteis para as medidas preventivas e terapêuticas. E, particularmente, para o desenvolvimento de métodos mais adequados para detecção (Almeida e Almeida, 2003).

2.5 SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA TÉRMICA

A resistência e sensibilidade a antimicrobianos foram testadas por Hofer et al. (1998). A bactéria se mostrou sensível à eritromicina, tetraciclina e cloranfenicol e resistente às cefalosporinas de terceira geração. Hofer et al. (1999) mostraram que *L. monocytogenes* sorotipo 4b foi resistente à cefoxitina, clindamicina, oxacilina e penicilina.

Quanto à resistência térmica, alguns estudos têm sido realizados há algum tempo para avaliar os efeitos sobre *Listeria* spp. Bearn e Girard (1958), por exemplo, demonstraram a eficiência da pasteurização de acordo com a quantidade inicial de *Listeria monocytogenes* no leite cru. Em quantidades inferiores a 5×10^3 no leite cru a pasteurização (61,7°C durante 35 minutos) se mostrou eficaz.

Bradshaw et al. (1985) demonstraram por meio de experimento que, se realizada de acordo com as recomendações do FDA (*Food and Drug Administration*), a pasteurização garante a destruição da *L. monocytogenes* no leite integral. Padilha et al. (2001) não encontraram *L. monocytogenes* em leite pasteurizado comercializado na cidade de Recife, Estado de Pernambuco. Segundo os autores, a ampla microbiota encontrada no leite pesquisado e os processos físicos e químicos empregados para destruí-la podem ter interferido no isolamento.

A indústria utiliza o sal e o frio como um método de preservação de alimentos. A habilidade de a *Listeria* sobreviver em altas concentrações de sal e a baixas temperaturas torna mais difícil o seu controle na indústria alimentícia (Gandhi e Chikindas 2007).

2.6 ALGUNS SURTOS E OCORRÊNCIAS EM ALIMENTOS

Entre 30 de junho e 30 de agosto de 1983, 49 pacientes no estado de Massachusetts, nos Estados Unidos, adquiriram listeriose. Sete casos ocorreram em fetos ou crianças e 42 em adultos imunossuprimidos. Quatorze pacientes morreram (29%). Das 40 amostras de *L. monocytogenes* isoladas e testadas, 32 eram do sorotipo 4b. Estudos epidemiológicos revelaram que a doença estava fortemente associada com a ingestão de uma bebida elaborada com leite integral ou parcialmente desnatado, pasteurizada. O leite envolvido no surto teve origem em fazendas onde, de acordo com as anotações do veterinário, ocorreram casos de listeriose em algumas vacas em lactação na mesma época do surto. Muitos sorotipos de *L. monocytogenes* foram encontrados no leite cru dessas fazendas após o surto. No local de beneficiamento do leite, nenhuma evidência de falha na pasteurização foi encontrada. Esses resultados levam a questionar a capacidade da pasteurização em erradicar grandes quantidades de *L. monocytogenes* em leite cru contaminado (Fleming et al., 1985).

Em um trabalho reportando seis casos clínicos de neurolisteriose em adultos, a idade variou de 27 a 71 anos, sendo quatro pacientes do sexo feminino e dois do sexo masculino. Três deles consumiam queijos artesanais com frequência (Salamano et al., 2005).

Silva et al. (1998) encontraram amostras de queijo positivas para *L. monocytogenes* em um estudo realizado no Rio de Janeiro. Foram analisadas 103 amostras de vários tipos de queijos e 1,8% estavam contaminadas com essa bactéria. Os queijos contaminados eram dos tipos Gorgonzola, Roquerfort e Minas frescal.

De 173 amostras coletadas em Portugal, provenientes de superfícies do ambiente e de

equipamentos de laticínios, 6,4% foram positivas para *L. monocytogenes*. Amostras de alimentos (carne, peixe, leite e frango) crus e processados também foram coletadas na mesma localidade durante um período de oito meses. Das 272 amostras analisadas, 6,6% estavam contaminadas com *L. monocytogenes* (Pinto et al., 2001).

Durante o período de um ano, foi pesquisada a presença de *L. monocytogenes* em duas plantas de processamento de leite no Reino Unido. Esta bactéria foi encontrada em 6,25% dos equipamentos, 40,6% no ambiente, 22,2% no leite cru e em nenhuma amostra de leite pasteurizado. Porém foi encontrada *L. welshimeri* no leite pasteurizado, indicando contaminação pós-processamento (Kells e Gilmour, 2004).

O queijo Minas frescal é um dos queijos mais populares produzidos no Brasil. Sua maior característica é um agradável gosto ácido. É um queijo fresco, macio, altamente perecível e possui validade curta, mesmo sob refrigeração. *Listeria monocytogenes* é psicrotrófica e suporta pH ácido. O crescimento desse microrganismo pode ocorrer neste tipo de queijo. De acordo com o fluxograma de fabricação do queijo Minas frescal, Silva et al. (2003) coletaram amostras em diferentes etapas do processamento deste queijo (recepção do leite cru, pasteurização, coagulação e estocagem). De um total de 218 amostras coletadas, 13 foram positivas para *Listeria* spp., sendo duas caracterizadas como *L. monocytogenes*.

No Rio de Janeiro, foi encontrada *L. monocytogenes* em um número significativo (13,3%) de amostras de salame (Borges et al., 1999). Segundo os autores, é necessário monitorar a presença desse patógeno, principalmente nesse tipo de produto, por ser consumido sem tratamento térmico. Em Florianópolis, Pelisser et al. (2001) analisaram 48 carcaças de frango de diferentes marcas, coletadas em

supermercados, detectando *L. monocytogenes* em 11 amostras (23%).

Lingüiças mistas do tipo frescal são produtos de origem animal que apresentam alta atividade de água e, por serem intensamente manipuladas e não serem submetidas a tratamento térmico, podem conter microrganismos patogênicos. Em um estudo realizado no Rio Grande do Sul, foi detectada *Listeria* spp. em todas as amostras analisadas. Foram coletadas amostras de matéria-prima, equipamentos e produto final. *Listeria monocytogenes* foi encontrada em 29,3%, inclusive no produto final, demonstrando a necessidade de readequação das práticas de limpeza e sanificação da planta de processamento (Silva et al., 2004).

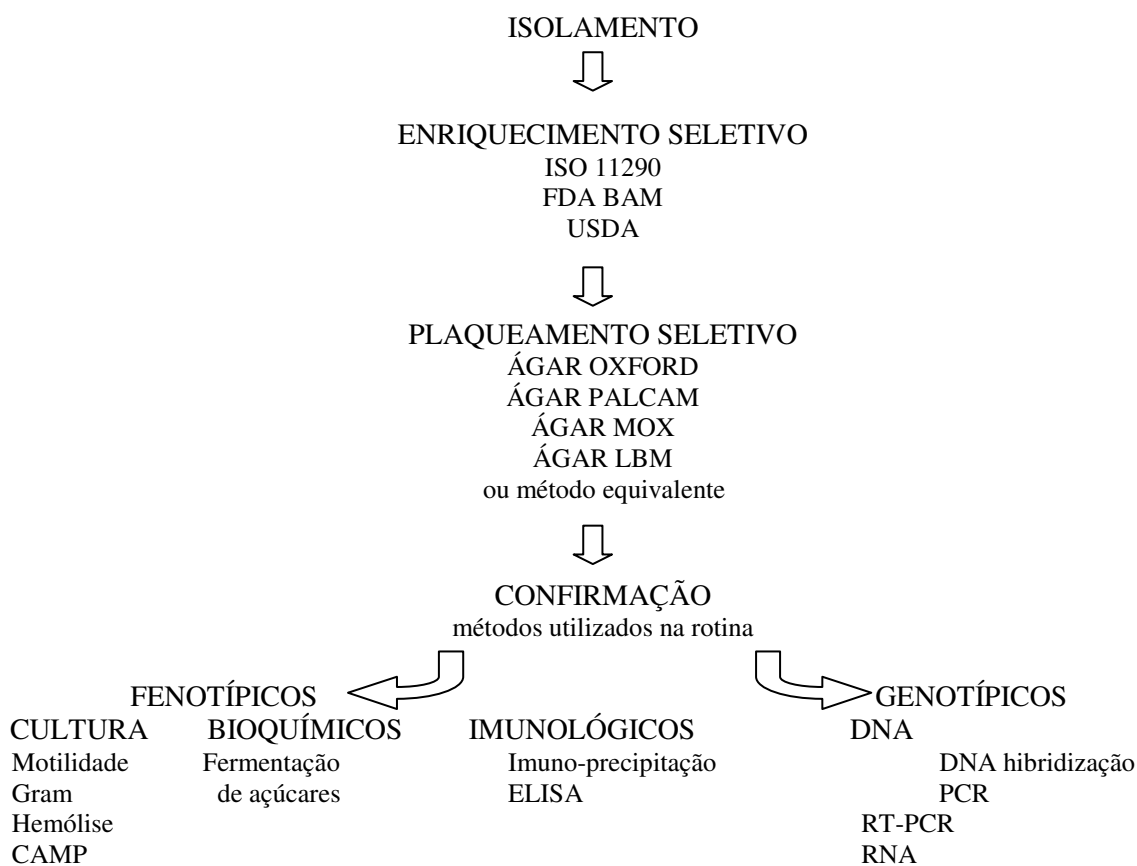
Em outro estudo, *L. monocytogenes* foi isolada em 307 das 3.685 amostras de vários produtos (carne crua e cozida, frango cru e processado, vegetais congelados, peixe defumado, leite cru e processado, e outros) que foram coletadas durante quatro anos em diferentes indústrias e mercados no norte da Espanha. Dentre as amostras positivas, 285 foram encontradas em produtos prontos para consumo. Este fato preocupa por serem esses alimentos consumidos sem prévio tratamento térmico. Atenção especial tem que ser dada para evitar a contaminação pós-processamento (Vitas et al., 2004).

A ocorrência de mastite bovina causada por *L. monocytogenes* é pouco descrita na literatura. Em um trabalho realizado por Gitter et al. (1980), *L. monocytogenes* sorotipo 4 foi isolada na amostra de leite colhida do quarto afetado. Porém, o exame histológico dos linfonodos e do tecido mamário não revelaram a presença da bactéria. A presença da *L. monocytogenes* no leite, segundo os autores, não significa que seja a causa da mastite.

2.7 MÉTODOS DE DETECÇÃO

O método 993.12 da *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)/International Dairy Federation (IDF)* é frequentemente o de escolha para detectar *Listeria monocytogenes* em produtos lácteos e possui instruções específicas para preparação das amostras de cada produto lácteo. Para detecção de *Listeria*, este método utiliza enriquecimento seletivo por 48 horas em um meio contendo acriflavina e ácido nalidíxico, para, então, ser plaqueado em ágar Oxford (Gasanov et al., 2005).

A metodologia convencional para o isolamento de *Listeria* spp. baseia-se no emprego de enriquecimento primário da amostra em meio líquido seletivo, seguido ou não de enriquecimento secundário, também em meio seletivo. A seguir, as alíquotas deste caldo de enriquecimento são semeadas em placas de meios sólidos seletivos e, após incubação, colônias suspeitas do microrganismo são identificadas através da avaliação de suas características (Figura 1), segundo Rodrigues et al. (2003).



Fonte: Gasanov et al. (2005)

Figura 1: Esquema de isolamento e identificação de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* em amostras de alimentos e do ambiente

Uma grande variedade de métodos bacteriológicos, incluindo meios de cultura, vem sendo proposta, objetivando agilizar o

rastreamento de *L. monocytogenes* em diversos tipos de alimentos (Silva et al., 1998).

Os caldos de enriquecimento apresentam composição básica muito semelhante, variando apenas a concentração e combinação dos agentes seletivos. Entretanto os meios de isolamento de *Listeria* apresentam um maior número de variáveis. De maneira geral, esses meios exploram a resistência da bactéria a vários antimicrobianos como, por exemplo, ácido nalidíxico, polimixina B, moxalactam, cefotetan, cicloheximida, entre outros. Estes antimicrobianos são usados em conjunto, com outros agentes seletivos, tais como feniletanol, cloreto de lítio, acriflavina, anidrido glicínico e telurito de potássio (Rodrigues et al., 2003).

Pini e Gilbert (1988) compararam a eficiência de práticas de isolamento de *L. monocytogenes*. Naquela época, era utilizado o resfriamento (4°C) por semanas ou até meses para favorecer o crescimento dessa bactéria em relação aos outros microrganismos, por ser psicrófila. O tempo para obtenção do resultado é a grande desvantagem do método. O enriquecimento pelo frio foi comparado com a técnica que

utiliza um caldo e depois incubação a 30°C por 24 e 48 horas. Após o período de incubação, foram feitos o plaqueamento e a identificação. Para as amostras de leite, não houve diferença significativa entre os métodos para detecção da *L. monocytogenes*. Porém, para as amostras de frango, o método de enriquecimento a 30°C foi o mais sensível.

A eficiência dos diferentes procedimentos para o isolamento de *L. monocytogenes* a partir de queijos está associada a inúmeros fatores, como características intrínsecas da amostra analisada (pH, atividade de água, potencial de óxido-redução, conteúdo em nutrientes, microbiota presente e a sua distribuição no alimento), seletividade dos meios de cultura e tipo de incubação (temperatura e atmosfera) (Silva et al., 1998). A Tabela 1 mostra vários meios utilizados para detecção de *Listeria* spp. e seus agentes seletivos e indicadores.

Tabela 1. Agentes seletivos e indicadores em alguns meios para detectar *Listeria monocytogenes*

Meio	Agentes seletivos e indicadores							Antibiótico
	Acriflavina	Glicina anidra	Fenil etanol	LiCl	Esculina	Telurito de K		
MMA	-	+		+	+	-	-	Cyclo
LPM	-	+		+	+	-	-	Mox
Mod. VJ	-	+		-	+	-	+	Mox,
Nal, B								
RAPAMY	+	-		+	-	+	-	Mox, Nal
PALCAM	+	-		-	+	+	-	Cz, Poly
ACA	+	-		-	-	-	-	Cz
Oxford	+	-		-	+	+	-	Ctt, Fos,
Col								
Mod. Oxford	-	-		-	+	+	-	Mox, Col
ASLM	+	-		+	+	+	-	Mox, Cz

Abreviações: MMA: agar McBride modificado; LPM: ágar Moxalactam feniletanol clorado; Mod VJ: ágar Vogel Johnson modificado; ACA: ágar acraflavina-ceftazidima; Mod Oxford: meio Oxford modificado; ASLM: meio Al-Zorecky-Sandine para *Listeria*; Cyclo: cycloeximida; Mox: oxalactam; Nal: ácido nalidíxico; B: bacitracina; Cz: ceftazidime; Poly: polimixina B; Ctt: cefotetan; Fos: fosfomicina; Col: colistina

Fonte: Farber e Peterkin (1991)

Para pesquisar a presença de *Listeria* em carcaças de frango, utilizaram-se dois métodos: o recomendado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), porém com uma segunda etapa de enriquecimento antes do plaqueamento e o método rápido Clearview (Oxoid, UK, Ltd). Com o primeiro método foram encontradas 14 carcaças positivas para *Listeria* spp., sendo sete caracterizadas como *L. monocytogenes*. Com o segundo método, detectaram-se 17 e 11 amostras positivas para *Listeria* e *Listeria monocytogenes*, respectivamente. Outra observação feita pelos autores é que, utilizando o método Clearview + API *Listeria*, o resultado confirmado para espécie foi obtido após 115-139 horas. Entretanto, com o método convencional modificado + API *Listeria* foram necessárias 120-160 horas. Os resultados obtidos pelos métodos utilizados mostraram-se moderadamente concordantes e não apresentaram diferença significativa (Pelliser et al., 2001).

Almeida e Almeida (2003) descreveram em uma revisão sobre detecção de *L. monocytogenes* os seguintes métodos: técnicas imunológicas (ELISA), sondas de DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR), RAPD-PCR (análise do polimorfismo de fragmentos de DNA amplificados ao acaso), bioluminescência, método de amplificação fágica e método fago-luciferase.

A PCR é uma técnica da biologia molecular que permite a amplificação de cópias múltiplas de uma sequência específica de DNA. Ela envolve ciclos múltiplos de desnaturação do DNA, anelamento dos iniciadores e extensão da fita, requer uma DNA polimerase termoestável (Taq DNA polimerase), Mg⁺⁺ como co-fator da Taq, deoxirribonucleotídeos (dNTP), iniciadores e um tampão de reação.

Em um experimento para detectar *L. monocytogenes* em biofilmes, Guilbaud et

al. (2005) utilizaram a técnica de PCR, em tempo real, baseada no uso de uma sonda fluorescente que se hibridiza com a sequência-alvo, gerando um sinal fluorescente que é acumulado durante a amplificação, proporcionalmente à concentração de produtos amplificados. É um sistema que permite correlacionar a intensidade de um sinal coletado com a quantidade de produto amplificado. O RAPD-PCR é uma técnica genética baseada na amplificação do DNA com um ou vários iniciadores de sequência arbitrária. Estes iniciadores detectam polimorfismos na sequência do DNA que podem ser usados como marcadores genéticos. Os perfis de RAPD são analisados em gel de poliacrilamida ou agarose quanto à presença ou ausência da banda para cada loco amplificado.

A RT-PCR pode ser utilizada para estimar a quantidade do microrganismo na amostra e ajudar a estudar o comportamento da *L. monocytogenes* frente à presença de outras bactérias produtoras de inibidores mostrando a atividade inibitória nesse patógeno (Guilbaud et al., 2005).

Vários autores utilizaram a PCR para diagnosticar a presença de *L. monocytogenes* em alimentos, órgãos, meio ambiente, água e fezes (Novga et al., 2000; Shen et al., 2006;)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Detectar *Listeria monocytogenes* inoculada em leite, após a etapa de enriquecimento seletivo, por meio da técnica de PCR.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar a identificação de amostras de *Listeria* spp. por meio de testes bioquímicos.

- Padronizar uma reação de PCR com culturas puras de *Listeria monocytogenes*.

- Avaliar a eficiência de amplificação da reação de PCR, utilizando-se três oligonucleotídeos diferentes.

- Avaliar a especificidade da reação de PCR testando-se diferentes estirpes de *Listeria monocytogenes*, bem como outras espécies de *Listeria* e outros gêneros bacterianos.

- Avaliar a sensibilidade da reação de PCR na identificação de *Listeria monocytogenes* inoculada em leite.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental do trabalho foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, Minas Gerais.

4.1 AMOSTRAS DE BACTÉRIAS

Neste estudo foram utilizados 41 amostras de *Listeria* spp., compreendendo: 31 amostras de *Listeria monocytogenes* e duas de *Listeria innocua* isoladas de ambiente de laticínios, de queijo e de produtos cárneos; quatro amostras-padrão de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111, ATCC 19117, ATCC 7644, SCOTT A), e uma amostra-padrão de cada uma das seguintes espécies: *Listeria innocua* (IAL 1984), *Listeria ivanovii* (IAL 1983), *Listeria seeligeri* (IAL 1985) e *Listeria welshimeri* (IAL 1986). Os isolados de ambiente, de queijo e de produtos cárneos foram gentilmente cedidos por outros laboratórios e estocados a -20°C e a -80°C para posterior utilização.

4.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS AMOSTRAS DE BACTÉRIAS

A identificação dos isolados foi confirmada por meio dos seguintes testes bioquímicos,

realizados de acordo com Barrow e Feltham (1993): coloração de Gram; produção de catalase; oxidase e de hemólise beta em ágar contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro; hidrólise da esculina; teste do Vermelho de Metila e de Voges- Proskauer (VM/VP); motilidade no meio de SIM; teste de CAMP com *Staphylococcus aureus* e *Rhodococcus equi* (*R. equi*); produção de ácido a partir de glicose, manitol, ramnose, xilose e ribose; hidrólise do hipurato de sódio e redução do nitrato. A identificação foi realizada de acordo com Quinn et al. (1994) e Bille et al. (2003).

4.2.1 Coloração de Gram

Inicialmente, uma colônia cultivada por 24 h foi homogeneizada com água destilada estéril em uma lâmina e fixada com calor. A lâmina foi coberta com solução de cristal violeta durante um minuto e, depois, o corante foi desprezado. Em seguida, a lâmina foi coberta com lugol, por mais um minuto e desprezou-se novamente o corante. Com a lâmina inclinada, gotejou-se álcool até não mais ocorrer desprendimento de corante (cerca de 15 segundos). Posteriormente, a lâmina foi rapidamente lavada em água corrente. Por fim, cobriu-se com safranina e aguardaram-se 45 segundos. A lâmina foi lavada, seca e observada ao microscópio óptico em objetiva de imersão (Barrow e Feltham, 1993).

4.2.2 Tipo de Hemólise

O tipo de hemólise foi determinado em ágar-sangue composto de meio TSA (*Trypticase Soy Agar*, Difco) adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro. A hemólise é denominada de alfa quando ocorre a destruição parcial de eritrócitos (o meio de cultura ao redor da colônia torna-se esverdeado). Quando ocorre a destruição total dos eritrócitos, a hemólise é classificada como beta, ou hemólise total. A cultura é considerada

não-hemolítica quando não se observa alteração do meio ao redor da colônia (Barrow e Feltham, 1993).

4.2.3 Teste de catalase

Este teste detecta a enzima catalase, que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Para a realização do teste, colheu-se uma colônia da placa de Petri contendo ágar BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco). Essa colônia foi colocada sobre uma lâmina de vidro. Em seguida, adicionou-se uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%, homogeneizando-se a colônia. O teste é positivo quando se observa a formação de bolhas de ar (Barrow e Feltham, 1993).

4.2.4 Motilidade no meio SIM

Esta prova teve como objetivo avaliar a motilidade do microrganismo. O teste foi feito em meio SIM (Biobrás). O meio foi inoculado até dois terços com uma colônia isolada da bactéria (18 - 24 horas de incubação) e incubado a 25°C, durante 3-5 dias. A motilidade é positiva quando o meio fica turvo e negativa quando o meio continua transparente e o crescimento bacteriano se restringe apenas ao longo da picada. *Listeria monocytogenes*, ao mover-se, produz um formato de guarda-chuva característico (Barrow e Feltham, 1993).

4.2.5 Teste do Vermelho de Metila (VM)

Este teste tem como princípio testar a habilidade de um microrganismo em produzir ácidos orgânicos, relativamente estáveis, a partir da fermentação da glicose, de modo a suplantarem a capacidade tampão existente no meio. No teste, é pesquisada a fermentação ácida mista, em que as bactérias utilizam a glicose como substrato e liberam grande concentração de ácidos como produto final (Ribeiro e Soares, 1998).

Com o auxílio de uma alça de inoculação, duas ou três colônias crescidas na placa de ágar-sangue a 35°C por 18 a 24 horas, sob aerobiose, foram inoculadas em um tubo contendo 2 ml de caldo peptona-glicose (preparado de acordo com Lennette et al., 1985). Após incubação a 35°C durante 7 dias, foram adicionadas ao tubo, duas a três gotas de uma solução hidroalcoólica de vermelho de metila. O vermelho de metila é um indicador que é ácido e indicará os graus de acidez por alterações de cor em uma escala de pH de 4,4 a 6,0. Com o pH de 4,4, o indicador fica vermelho e com a diminuição da acidez (pH 6,0), o indicador fica amarelo. O tubo foi agitado vigorosamente várias vezes durante 30 minutos. A reação é positiva quando ocorre a coloração avermelhada do tubo ao final dos 30 minutos. A coloração rósea do tubo é interpretada como teste fracamente positivo (Barrow e Feltham, 1993).

4.2.6 Teste de Voges-Proskauer (VP)

O teste de Voges-Proskauer é usado para determinar a habilidade de um microrganismo produzir um composto neutro, o acetilmetilcarbinol (acetoína), a partir da fermentação da glicose (Ribeiro e Soares, 1998).

Com o auxílio de um *swab* estéril, a cultura crescida na placa de ágar-sangue a 35°C por 18 a 24 horas, sob aerobiose, foi inoculada em um tubo contendo caldo peptona-glicose (também usado para o teste do Vermelho de Metila), incubado a 35°C durante 24 horas. Após o período de incubação e a realização do teste VM, foram adicionados ao tubo 0,6 mL de solução A (α -naftol 5%) e 0,2 mL de solução B (hidróxido de sódio 40%). O tubo foi agitado vigorosamente várias vezes, para o oxigênio atmosférico penetrar e oxidar a acetoína em diacetila, sendo que o hidróxido de potássio atua como agente oxidante e o α -naftol como catalisador e intensificador de cor. Com o uso de um agente oxidante, a cor produzida desaparece rapidamente,

sobretudo porque o complexo de reação diacetila-peptona pode ser rapidamente oxidado em um composto incolor. Portanto, a reação positiva é obtida quando ocorre a coloração vermelha do tubo entre 15 minutos e 1 hora. A coloração rósea do tubo é interpretada como teste fracamente positivo e a coloração marrom-esverdeada, como resultado negativo (Ribeiro e Soares, 1998).

4.2.7 Teste de CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peterson)

Este teste foi realizado em uma placa de Petri contendo ágar-sangue, na qual inicialmente inoculou-se, em uma linha vertical, uma amostra de *Staphylococcus aureus* β -hemolítico e em uma outra linha vertical, paralela à primeira, uma amostra de *Rhodococcus equi*. Em seguida, em posição perpendicular às linhas de inoculação de *S. aureus* e *R. equi*, inoculou-se a amostra a ser testada sem que esta tocasse as outras. A placa, então, foi incubada a 35°C, durante 24 horas.

O resultado é positivo quando a amostra testada produzir uma substância, a qual consiste em uma proteína extracelular (fator CAMP), que aumenta a área de hemólise produzida por *S. aureus* e por *R. equi*. Neste caso, ocorre a formação de uma área de hemólise típica (forma de meia-lua) na junção das duas culturas (Barrow e Feltham, 1993).

4.2.8 Teste de oxidase

O princípio do teste consiste na detecção de indofenol (citocromo-oxidase). Tiras para reação de oxidase (Laborclin) foram utilizadas. Com o auxílio de um palito de madeira estéril, transferiram-se assepticamente uma ou duas colônias da amostra para a superfície da tira. A coloração violeta da tira caracteriza o teste de oxidase positivo (Barrow e Feltham, 1993).

4.2.9 Hidrólise da esculina

O teste foi realizado em tubos de ensaio contendo ágar TSA com 1% de esculina e 0,5% de cloreto férrico. O meio foi inoculado com uma ou duas colônias de uma cultura de 24 h e incubado a 35°C, por até 7 dias.

Quando a bactéria é capaz de hidrolisar a esculina, presente no meio contendo cloreto férrico, ocorre a formação de dois compostos: esculina e um sal metálico, os quais originam um composto marrom escuro. Daí a reação positiva do teste ser caracterizada pelo escurecimento do meio (Quinn et al., 1994).

4.2.10 Hidrólise do hipurato de sódio

Este teste foi realizado em caldo HI (*Heart Infusion*, Difco), contendo 1% de hipurato de sódio. O meio foi inoculado com uma ou duas colônias da amostra crescida em ágar-sangue e depois, incubado a 35°C durante 14 dias. Após o período de incubação, o meio foi centrifugado a 2.500 g durante 10 minutos e 0,8 ml do sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio. Após a adição de 0,2 ml de cloreto férrico, agitou-se o tubo. O resultado é positivo quando houver formação de um precipitado, o qual deve permanecer por mais de 10 minutos, e turvação do meio. Este precipitado indica a presença de ácido benzóico, resultante da hidrólise do hipurato. O resultado é negativo quando, após a agitação, o tubo fica claro e assim permanece. Uma reação fracamente positiva, ou seja, quando ocorre a formação de pouco precipitado, pode acontecer com algumas amostras (Facklam e Elliott, 1995).

4.2.11 Formação de ácidos a partir de carboidratos

Foi investigada a formação de ácidos a partir dos carboidratos D-glicose, manitol, ramnose, ribose e xilose. O princípio do teste se baseia em determinar a capacidade

de um microrganismo em hidrolisar o carboidrato incorporado em um meio base, com conseqüente produção de ácido.

O teste foi realizado em tubo com BHI contendo 1% do carboidrato específico e o indicador púrpura de bromocresol. Várias colônias crescidas em ágar-sangue durante 24 horas foram transferidas para esses tubos contendo os diferentes carboidratos e incubados a 35°C por até 14 dias. A reação é positiva quando houver alteração da coloração do meio para amarelo, e negativa quando o meio permanece inalterado (Facklam e Elliott, 1995).

4.2.12 Redução do nitrato

Para a realização deste teste, utilizou-se o caldo nitrato (preparado de acordo com Barrow e Feltham, 1995). Foram transferidas duas a três colônias da amostra para o tubo. Após incubação a 37°C por 5 dias, adicionou-se 1 ml do reagente A (ácido sulfanílico 0,33% em ácido acético 5N) e 1 ml do reagente B (0,5% de α -naftilamina em ácido acético 5N). A reação é positiva quando houver alteração da coloração do meio para vermelho, indicando a presença de nitrito, ou seja, a redução do nitrato, e negativa quando o meio permanece inalterado (Barrow e Feltham, 1993).

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA DAS CULTURAS BACTERIANAS

Para a extração de DNA das culturas bacterianas, utilizou-se o método descrito por Jersek et al. (1996), no qual foram utilizados fenol e clorofórmio. Após a padronização da PCR, outros dois métodos foram utilizados para extração de DNA de amostras de *Listeria* spp., sendo um de lise térmica segundo Nunes et al. (1999) e outro para cultura em meio sólido, no qual a lise térmica foi feita diretamente da colônia, segundo Hu et al. (1999).

4.3.1 Extração utilizando fenol e clorofórmio (Jersek et al., 1996)

Uma colônia de uma cultura cultivada por 24 horas foi inoculada em 3 ml de BHI e este foi incubado a 35°C durante a noite, sem agitação.

Aproximadamente 2 ml do caldo BHI inoculado foi transferido para um microtubo estéril e centrifugado a 12.000 g durante 3 minutos. O sobrenadante foi imediatamente desprezado e foram adicionados 500 μ l de tampão 1 X SSC (0,15 mol/l NaCl, 0,015 mol/l citrato de sódio), seguindo-se agitação em agitador de tubos e nova centrifugação.

O sobrenadante foi desprezado, adicionaram-se 100 μ l de água ultra pura (Milli-Q) e 8 μ l de lisozima (50 mg/ml) e foi feita incubação em tubo estático a 35°C durante 45 minutos sem agitação. Após o período de incubação, foram adicionados 200 μ l de TE (0,05 mol/l Tris-HCl, pH 8,0, 0,02 mol/l Na₂EDTA), 100 μ l de Sarkosyl (5% em TE) e 100 μ l de Proteinase K (25 mg/ml em TE) e a amostra foi incubada a 35°C durante uma hora em tubo estático.

Às células lisadas, adicionaram-se 250 μ l de fenol e 250 μ l de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Foi feita agitação manual vigorosa por aproximadamente 1 minuto e centrifugação a 12.000 g durante 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e as duas etapas anteriores repetidas, agitando-se o tubo com menos vigor.

Após as repetições, adicionaram-se 500 μ l de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), agitou-se manualmente o tubo com cuidado por 30 segundos e centrifugou-se a 12.000 g durante mais 5 minutos. Novamente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo no qual foram adicionados 200 μ l de acetato de sódio 3M e 400 μ l de etanol (100%) para precipitação dos ácidos nucléicos. Este tubo foi centrifugado a 12.000 g durante 30

minutos. Por fim, suspendeu-se o *pellet*, com cuidado, em 40 µl de água Milli-Q, e este foi mantido em geladeira durante a noite. O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro e congelado a -20°C.

4.3.2 Método de lise térmica

Transferiu-se 2 ml de uma cultura de 18 horas em caldo BHI para um microtubo estéril. Após centrifugação a 5.000 g durante 4 minutos, o sobrenadante foi desprezado, o *pellet* foi lavado três vezes com 500 µl de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,8) e submetido a uma centrifugação por dois minutos a 5.000 g. O *pellet* foi suspenso novamente em 100 µl de TE e ferveu-se por 10 minutos. Em seguida foi feita centrifugação a 12.000 g durante 30 segundos e o sobrenadante foi estocado a -20°C para posterior utilização (Nunes et al., 1999).

4.3.3 Método de lise térmica diretamente da colônia

Utilizou-se o método de lise térmica descrito por Hu et al. (1999) para as colônias

características de *L. monocytogenes* crescidas no meio TSYEA.

Uma colônia selecionada foi suspensa em 100 µl de água Milli-Q em microtubo estéril. Em seguida, o microtubo foi mantido durante 10 minutos em água fervente, seguindo-se centrifugação durante dois minutos a 12.000 g. Dois microlitros deste lisado foram utilizados na PCR.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A quantificação de DNA foi feita em espectrofotômetro de luz ultravioleta visível (Gene Quant Pro, Amesham Biosciences) e as concentrações de DNA ajustadas para a reação de PCR (50-100 ng/µl).

4.5 PADRONIZAÇÃO DA PCR

4.5.1 Oligonucleotídeos iniciadores

Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos, descritos na literatura (Tabela 2).

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR para identificação de *Listeria monocytogenes*

Oligonucleotídeos	Gene-alvo	Produto codificado	Produto amplificado	Referência
LMA: CGGAGGTTCCGCAAAGATG LMB: CCTCCAGAGTGATCGATGTT	<i>hlyA</i>	Listeriolisina O	234 pb	Furrer et al. (1991)
IAP1: ACAAGCTGCACCTGTTGCAG IAP2: TGACAGCGTGTGTAGTAGCA	<i>iap</i>	<i>Invasion associated protein</i>	131 pb	Niederhauser et al. (1993)
LM1: CCTAAGACGCCAATCGAA LM2: AAGCGCTTGCAACTGCTC	<i>hlyA</i>	Listeriolisina O	702 pb	Border et al. (1990)

4.5.2 PCR

As PCR's foram padronizadas com DNA extraído das amostras-padrão de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111, ATCC 19117, ATCC 7644, SCOTT A), *Listeria*

innocua (IAL 1984), *Listeria ivanovii* (IAL 1983), *Listeria seeligeri* (IAL 1985) e *Listeria welshimeri* (IAL 1986). As reações foram realizadas em termociclador (GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems). Adicionou-se 1 µl de DNA bacteriano (100 ng/µl) à uma mistura

contendo 1 µl de cada oligonucleotídeo (10 µM), 5 µl de tampão de PCR 10 X, 1,5 µl de MgCl₂ (50mM), 1 µl da mistura de nucleotídeos (10 mM), 0,2 U de Taq polimerase e água Milli-Q para completar um volume de 50 µl. As condições de amplificação foram: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos à temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos (50°C para LM1/LM2 e 55°C para LMA/LMB e IAP1/IAP2) e 45 segundos a 72°C, e uma extensão final de 5 minutos a 72°C, como descrito por Aznar e Alarcón (2003). Como controle positivo da reação, utilizou-se DNA extraído da amostra de *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, e como controle negativo, água Milli-Q esterilizada.

Foram feitas tentativas para amplificar os três fragmentos de DNA (oligonucleotídeos LM1/LM2, LMA/LMB e IAP1/IAP2) em uma mesma reação (PCR *multiplex*), testando-se diferentes concentrações de MgCl₂, DNA bacteriano, temperaturas de anelamento e oligonucleotídeos iniciadores.

4.5.3 Eletroforese em gel de agarose

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) após, aproximadamente, uma hora utilizando-se 70 volts. O gel de agarose foi submerso em solução de brometo de etídio (0,005%, p/v) durante 30 minutos e

fotografado em fotodocumentador (Eagle Eye II, Stratagene). Utilizou-se marcador de peso molecular de 100 pb (Promega) para estimativa do tamanho dos produtos de PCR.

4.6 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DA PCR PARA *Listeria monocytogenes*

4.6.1 Avaliação da especificidade

A especificidade de duas reações de PCR, a primeira com os oligonucleotídeos LM1/LM2 e a segunda com os oligonucleotídeos LMA/LMB e IAP1/IAP2 (PCR *multiplex*), foi avaliada utilizando-se as amostras de *Listeria* spp. descritas no item 4.1 e amostras pertencentes a outros gêneros bacterianos: *Escherichia coli* (ATCC 11775 e ATCC 11229), *Shigella sonnei* (CIP 6310), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Salmonella Tiphymurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*. As bactérias utilizadas foram escolhidas por serem encontradas em leite e por estarem disponíveis no banco de bactérias da EMBRAPA Gado de Leite – Juiz de Fora/MG. Para a avaliação da especificidade, utilizou-se na PCR, DNA extraído pelo método do fenol-clorofórmio.

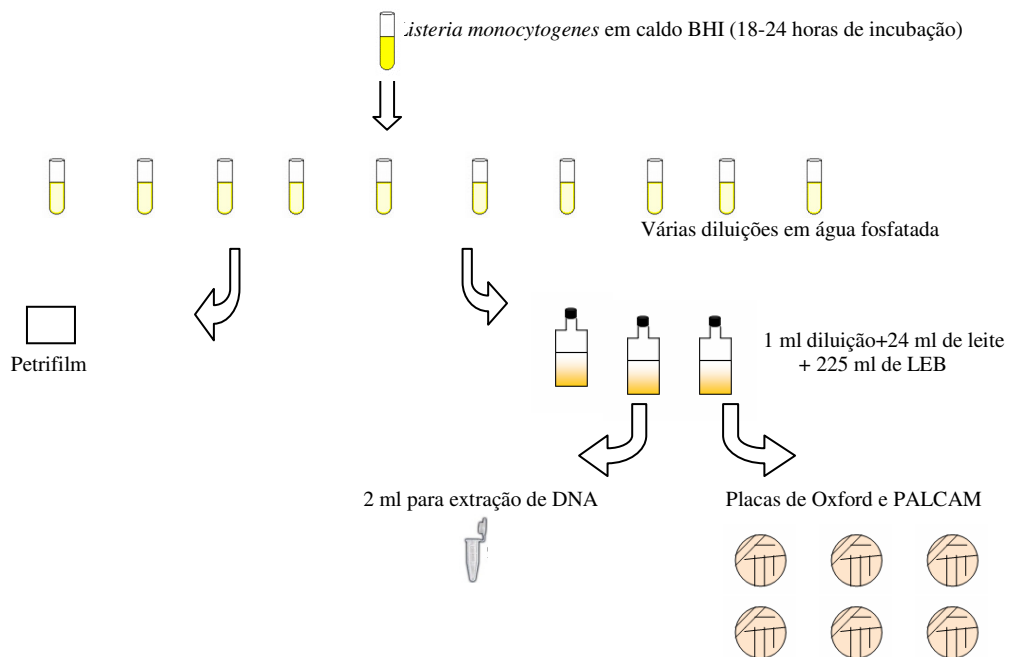


Figura 2: Fluxograma de comparação dos métodos de PCR e convencional para detecção de *Listeria monocytogenes*

4.6.2 Avaliação da sensibilidade

Realizaram-se ensaios para avaliar se a PCR padronizada teria potencial para identificar até uma única célula bacteriana, partindo-se de leite esterilizado e com diferentes níveis de contaminação bacteriana. O leite foi coletado diretamente no tanque de expansão com garrafas e coletores estéreis e também no Laticínio Cândido Tostes com garrafas estéreis.

4.6.2.1 Determinação da concentração celular de um cultivo de *Listeria monocytogenes*

Duas colônias de *Listeria monocytogenes* de um cultivo de 18 horas foram inoculadas em 4 mL de caldo BHI e incubadas a 35°C por 18 horas. Foram feitas diluições decimais em tampão fosfato (as diluições decimais foram preparadas até a extinção - 10^{10} ou mais) e inoculadas, em duplicata, em

Petrifilm™ (3M) para contagem total de microrganismos mesofílicos. Os filmes foram incubados a 37°C por 24 horas e ao final deste período, realizou-se a contagem bacteriana (UFC/ml). Este experimento foi repetido três vezes e foi determinada a contagem bacteriana (UFC/mL) média.

Para a avaliação da sensibilidade da PCR, inocularam-se experimentalmente as diluições acima em leite esterilizado (110°C/10 minutos) e leite cru com baixa e alta contaminação.

4.6.2.2 Determinação da sensibilidade da PCR em detectar *Listeria monocytogenes* em leite esterilizado a 110°C/10 minutos

Foram feitas diluições decimais de uma cultura da amostra-padrão *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 cultivada em caldo BHI por 24 h/35°C, diluindo-se 0,6 ml da cultura em 5,4 mL de tampão fosfato, até

se obter a extinção celular. Para as diluições contendo cerca de 100, 10, 1 e 0 UFC/ml, foi feito plaqueamento de 1 ml da diluição em duplicata em Petrifilm™ (para determinar o número de UFC/mL após 24 e 48 horas de incubação a 30°C) e inoculação de 1 ml em cada 3 frascos contendo 24 ml de leite em pó desnatado reconstituído estéril (Molico desnatado, – Nestlé). O leite com o cultivo bacteriano foi transferido para um frasco contendo 225 ml de caldo LEB (*Listeria Enrichment Broth*, Difco). O controle negativo foi feito utilizando apenas água fosfatada estéril, caldo LEB e leite. Os frascos foram incubados por 24-48h/30°C e foi realizada a extração de DNA de 2 ml da cultura de cada frasco pelo método de lise térmica, descrito por Nunes et al. (1999) e fenol-clorofórmio, descrito por Jersek et al. (1996). O DNA assim extraído foi usado na PCR (com os oligonucleotídeos LM1/LM2) para determinar a sensibilidade da técnica, ou seja, o menor número de UFC presentes no leite que o método seria capaz de detectar. Também foi feito o plaqueamento segundo o método convencional (Flowers et al, 1992). Este ensaio foi repetido duas vezes visando analisar a repetibilidade.

4.6.2.3 Determinação da sensibilidade da PCR em detectar *Listeria monocytogenes* em leite cru com baixa contaminação microbiana inicial e em leite cru com alta contaminação microbiana inicial

Os ensaios foram feitos com leite cru (contagem bacteriana total inferior a 1×10^4 UFC/ml), proveniente na Embrapa Gado de Leite, Campo Experimental de Coronel Pacheco, coletado utilizando material asséptico, e com leite cru (contagem bacteriana total maior que 1×10^6 UFC/ml), obtido no Instituto de Laticínios da Cândido Tostes/EPAMIG. Realizou-se o mesmo procedimento descrito no item 4.6.2.2, substituindo-se o leite estéril por leite cru com as diferentes contaminações.

4.7 COMPARAÇÃO DA PCR COM O MÉTODO CONVENCIONAL

O frasco contendo o caldo de enriquecimento (LEB) inoculado foi incubado a 30°C por 24-48 horas. A partir do caldo de enriquecimento, foram feitas estrias em duas placas de ágar Oxford (Difco) e duas de ágar PALCAM (Difco). Os meios foram incubados a 35°C por 24-48 horas. Após o período de incubação, as placas foram examinadas para colônias típicas de *Listeria* spp. Em ambos os meios, as colônias de *Listeria* spp. apresentam-se com 2 a 3 mm de diâmetro e com halos castanhos ou negros, devido à hidrólise da esculina. De cada placa de isolamento foram selecionadas duas colônias típicas ou suspeitas, as quais foram estriadas em ágar TSYEA (ágar triptona extrato de levedura, Difco), de modo a obter colônias bem isoladas. As placas de TSYEA foram incubadas a 35°C por 24 horas ou até que o crescimento fosse satisfatório para a realização dos testes bioquímicos de identificação e da reação de PCR a partir da colônia suspeita (Harrigan, 1998; Hitchins et al. 1998).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS BACTÉRIAS

As amostras de *Listeria* spp. apresentaram-se como bastonetes Gram-positivo, móveis e com crescimento característico (formato de guarda-chuva) no meio de SIM, resultado positivo nos testes de produção de catalase e hidrólise da esculina e negativo para a produção de oxidase, formaram ácido a partir da D-glicose, mas não a partir do manitol, e nem reduziram o nitrato. As demais características podem ser visualizadas na Tabela 3.

Tabela 3. Caracterização bioquímica e amplificação por PCR de amostras de *Listeria* spp. isoladas do ambiente, de queijo e de produtos cárneos, e de amostras-padrão de *Listeria* spp.

Nº amostras	Procedência	HEM	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	HIP	RAM	XYL	RIB	VM	VP	PCR - LMA	PCR - IAP	PCR - LM1	Identificação
13	ambiente/MG	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
2	ambiente/MG	+	+	+/-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
1	ambiente/MG	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
1	frango/MG	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
11	queijo/RS	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
2	queijo/RS	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
1	queijo/RS	+	+	+/-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
1	queijo/RS	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>L. innocua</i>
1	lingüiça/RS	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>L. innocua</i>
1	ATCC 19111	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
1	ATCC 19117	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
1	ATCC 7644	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
1	SCOTT A	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
1	IAL 1984	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>L. innocua</i>
1	IAL 1983	+	-	+	-	-	+	+	+/-	+	-	-	-	<i>L. ivanovii</i>
1	IAL 1985	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	<i>L. seeligeri</i>
1	IAL 1986	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	<i>L. welshimeri</i>
41														TOTAL

Abreviaturas: HEM – hemólise; *S. aureus* – CAMP com *S. aureus*; *R. equi* – CAMP com *R. equi*; HIP – hidrólise do hipurato; RAM – ramnose; XYL – xilose; RIB – ribose; VM – vermelho de metila; VP – Voges-Proskauer

As amostras-padrão ATCC 1911, IAL 1984, IAL 1983, IAL 1985 e IAL 1986 apresentaram algumas características atípicas (Tabela 3, resultados sombreados). É possível que não tenham mais a expressão gênica de algumas características, por exemplo, hemólise, pelo fato das mesmas não serem necessárias à sobrevivência no ambiente, como citado por Almeida e Almeida (2003).

5.2 PADRONIZAÇÃO DA PCR

As PCR's empregaram dois pares de oligonucleotídeos que amplificam o gene da listeriolisina O (oligonucleotídeos LM1/LM2 e LMA/LMB) e um par de

oligonucleotídeos que amplifica o gene que codifica uma proteína associada à invasão da célula hospedeira (*invasion associated protein*, oligonucleotídeos IAP1/IAP2).

Vários ensaios foram feitos utilizando-se a amostra-padrão *Listeria monocytogenes* ATCC 19117. Nos ensaios, variou-se a concentração de oligonucleotídeos, MgCl₂, Taq polimerase, mistura de nucleotídeos, DNA bacteriano e temperatura de anelamento. Foi testada uma reação de PCR *multiplex* com todos os oligonucleotídeos, porém não foi obtido nenhum produto de amplificação. Uma reação de PCR *multiplex* com os oligonucleotídeos LMA/LMB e IAP1/IAP2 apresentou produtos de amplificação bem nítidos (Figura 3).

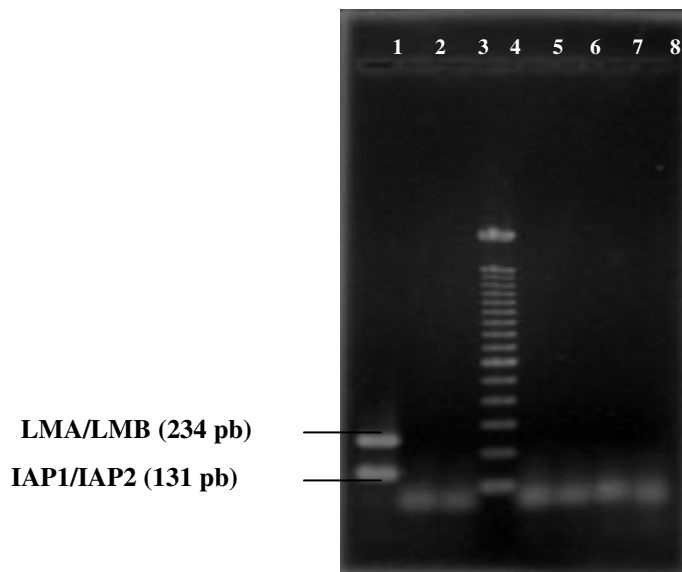


Figura 3. Reação de PCR *multiplex* com os oligonucleotídeos LMA/LMB e IAP1/IAP2. Canaleta 1: *L. monocytogenes* ATCC 19117; canaleta 2: *Streptococcus uberis*; canaletas 3 e 5: *Streptococcus agalactiae*, canaleta 4: marcador de peso molecular de 100 pb; canaletas 6 e 7: *Staphylococcus aureus*; canaleta 8: controle negativo

Todas as amostras de *Listeria* spp. foram testadas com os três oligonucleotídeos. Todas as amostras de *L. monocytogenes* apresentaram produtos de amplificação com os três oligonucleotídeos testados: 702 pb (LM1/LM2), 234 pb (LMA/LMB) e 131 pb (IAP1/IAP2). Uma amostra de *L. innocua* apresentou produtos de amplificação com os oligonucleotídeos LMA/LMB e IAP1/IAP2 (Tabela 2). As demais espécies de *Listeria* e os outros gêneros bacterianos não apresentaram produto de amplificação com os oligonucleotídeos testados. Desta forma, verificou-se que os três pares de oligonucleotídeos apresentaram uma boa eficiência de amplificação, pois detectaram todas as amostras de *L. monocytogenes*. Os oligonucleotídeos LM1/LM2 também foram específicos, pois só amplificaram amostras de *L. monocytogenes*.

Como apresentam temperaturas de anelamento idênticas, os oligonucleotídeos LMA/LMB e IAP1/IAP2 foram usados com sucesso na mesma reação (PCR *multiplex*), o mesmo não ocorrendo com os

oligonucleotídeos LM1/LM2, que apresentam temperatura de anelamento inferior, como já descrito por Aznar e Alarcón (2003). Desta forma, foram necessárias duas reações diferentes para obter os resultados com os três oligonucleotídeos.

Apesar de serem específicos para *L. monocytogenes*, a reação com os oligonucleotídeos LM1/LM2 pode dar origem a bandas inespecíficas (Figura 4), que, no entanto, apresentam peso molecular diferente de 702 pb, não interferindo, portanto, na identificação de *L. monocytogenes*. Este fato também foi reportado por Aznar e Alarcón (2003). Os mesmos oligonucleotídeos foram utilizados por Rijpens e Herman (2004) para identificar *L. monocytogenes* em amostras de queijos contaminados artificialmente com diferentes concentrações desse microrganismo.

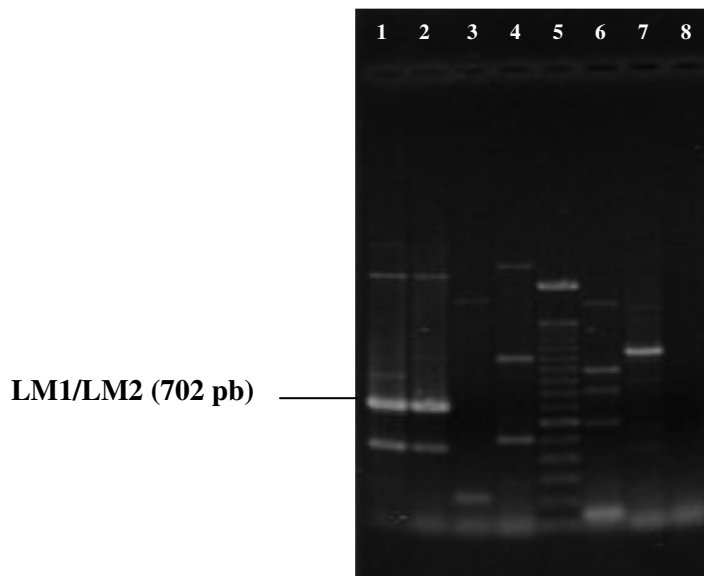


Figura 4. PCR com os oligonucleotídeos LM1/LM2. Canaleta 1: *L. monocytogenes* ATCC 19117; canaleta 2: *L. monocytogenes*; canaleta 3: *L. innocua* IAL 1984; canaleta 4: *L. ivanovii* IAL 1983; canaleta 5: marcador de peso molecular de 100 pb; canaleta 6: *L. seeligeri* IAL 1985; canaleta 7: *L. welshimeri*; canaleta 8: controle negativo da reação de PCR.

A extração por fenol e clorofórmio resultou em DNA em quantidade e qualidade superior, revelado pela leitura em espectrofotômetro, quando comparado com o DNA extraído por lise térmica. Entretanto, com os dois protocolos de extração houve a amplificação de bandas específicas e nítidas (Figura 5).

Os protocolos de extração por lise térmica são mais rápidos e utilizam apenas quantidades pequenas de soluções-tampão, portanto, sendo mais econômicos. Além disso, oferecem menos riscos à saúde do manipulador por não utilizar o fenol e menos impactos ao meio ambiente. Os protocolos podem ser utilizados quando não existe a necessidade de conservar o DNA bacteriano para futuros experimentos. Neste último caso, deve-se optar pelo protocolo convencional de extração por fenol e clorofórmio.

5.3 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA PCR EM DETECTAR *Listeria monocytogenes* EM LEITE ESTERILIZADO A 110°C/10 MINUTOS

A PCR realizada com amostra de bactérias após 48 horas de enriquecimento em meio seletivo para *Listeria* (LEB), detectou a presença de *L. monocytogenes* no leite inoculado com a diluição na qual apenas uma colônia cresceu em Petrifilm™ (1 UFC/ml). Também, houve crescimento da bactéria nas placas de Oxford e PALCAM que posteriormente, foram analisadas pela metodologia convencional. Neste ensaio não houve diferença na sensibilidade de detecção entre a técnica de PCR e a metodologia convencional. A sensibilidade de detecção de ambos os métodos coincidiu em todas as repetições e variou de 1 a 4 UFC/ml (Tabela 4 e Figura 5).

Tabela 4. Comparação entre os métodos Convencional e PCR na detecção de *Listeria monocytogenes* inoculada em leite estéril

	Diluição	Inóculo de <i>L. monocytogenes</i>	Convencional			PCR		
			A*	B*	C*	A*	B*	C*
Repetição 1	10 ⁻⁸	41 UFC	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻⁹	4 UFC	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻¹⁰	4 UFC	-	+	-	-	+	-
	10 ⁻¹¹	0 UFC	-	-	+	-	-	+
Repetição 2	10 ⁻⁸	48 UFC	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻⁹	4 UFC	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻¹⁰	2 UFC	-	-	+	-	-	+
	10 ⁻¹¹	0 UFC	-	-	-	-	-	-
Repetição 3	10 ⁻⁸	48 UFC	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻⁹	8 UFC	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻¹⁰	1 UFC	-	+	-	-	+	-
	10 ⁻¹¹	0 UFC	-	-	-	-	-	-

* A, B e C: triplicatas para cada repetição

+: positivo após incubação a 30°C/48 h em meio de enriquecimento (LEB)

-: negativo após incubação a 30°C/48 h em meio de enriquecimento (LEB)

Nenhuma bactéria foi detectada pela PCR quando esta foi realizada após 24 horas de incubação em caldo de enriquecimento (LEB), nem com DNA extraído por fenol-clorofórmio (Jersek et al., 1996), nem com DNA extraído por lise térmica (Nunes et al., 1999). O DNA extraído por ambas as técnicas foi quantificado em espectrofotômetro.

A dificuldade em se detectar *L. monocytogenes* com 24 horas de incubação pode ser devido à baixa quantidade do microrganismo ou pureza do DNA. Rijpens e Herman (2004) e Guilbaud et al. (2005) comentam em seus trabalhos que os métodos rápidos utilizados, atualmente, para identificar *L. monocytogenes* necessitam de uma concentração mínima do microrganismo de 10⁵ UFC/ml.

Tabela 5. Concentração de DNA bacteriano total obtido por extração de DNA utilizando fenol-clorofórmio após 24 e 48 horas de incubação em caldo de enriquecimento (LEB).

Diluição	Concentração de DNA (ng/μl)	
	24 horas	48 horas
10 ⁻⁸	197,5	1.210,5
10 ⁻⁹	210,0	1.124,0
10 ⁻¹⁰	128,0	1.276,5
10 ⁻¹¹	222,0	1.089,0
10 ⁻¹²	213,0	600,0
10 ⁻¹³	127,0	375,5

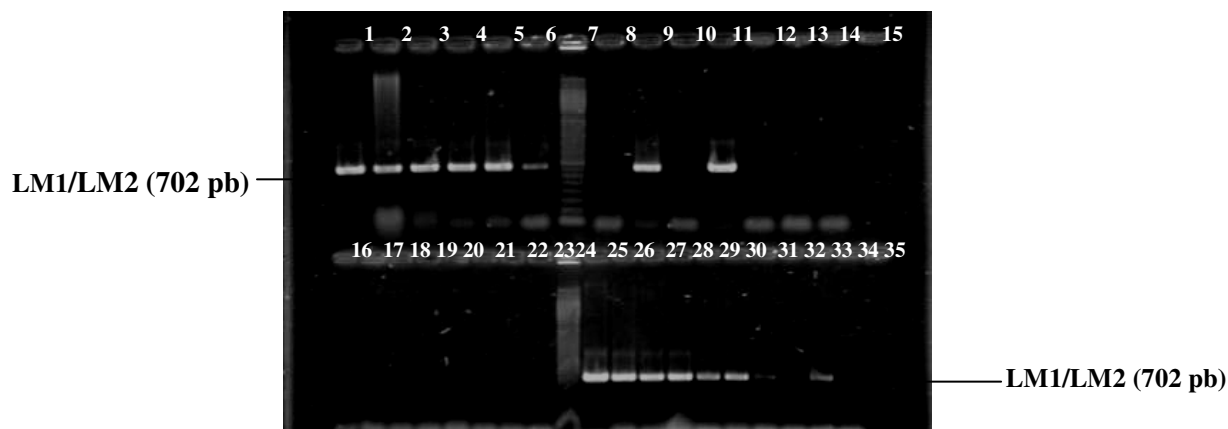


Figura 5. PCR com os oligonucleotídeos LM1/LM2 após a etapa de enriquecimento a 30°C/48 h, com diferentes diluições de *L.monocytogenes*. Canaletas 1,2 e 3: extração de DNA por lise térmica do leite contaminado inicialmente com 48 UFC/ml; 4, 5 e 6: extração de DNA por lise térmica do leite contaminado inicialmente com 8 UFC/ml; 7 e 24: marcador de peso molecular (100 pb); 8, 9 e 10: extração de DNA por lise térmica do leite contaminado inicialmente com 1 UFC/ml; 11 e 25: controles positivos; 12 a 21: extração de DNA por lise térmica do leite inoculado com diluições nas quais não foi observado crescimento bacteriano no Petrifilm; 22: controle negativo não inoculado; 23: controle negativo da PCR; 26, 27 e 28: extração de DNA utilizando fenol-clorofórmio do leite contaminado inicialmente com 48 UFC/ml; 29, 30 e 31: extração de DNA utilizando fenol-clorofórmio do leite contaminado inicialmente com 8 UFC/ml; 32,33 e 34: extração de DNA utilizando fenol-clorofórmio do leite contaminado inicialmente com 1 UFC/ml; 15 e 35 vazio

Na Figura 5, observa-se que quando utilizado o fenol-clorofórmio, a banda foi enfraquecendo à medida que foi diminuindo a concentração de DNA. Provavelmente, houve perda de DNA durante o procedimento de extração. Neste procedimento são realizadas extrações sucessivas com fenol e clorofórmio 1:1 para purificar completamente os ácidos nucléicos. Entretanto, cada etapa de mistura e centrifugação é responsável por quebras nas moléculas de DNA e perda do DNA total (Brown, 2003). Com uma menor quantidade de DNA disponível, o fragmento amplificado se torna cada vez mais fraco.

5.4 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA PCR EM DETECTAR *L. monocytogenes* EM LEITE CRU COM BAIXA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA INICIAL

Neste ensaio, a PCR não detectou *L. monocytogenes* após 48 horas de enriquecimento em meio seletivo para *Listeria* (LEB) em nenhuma diluição, em nenhuma repetição e com nenhum dos dois métodos de extração de DNA.

A sensibilidade de detecção de *L. monocytogenes* pela metodologia convencional variou de 2 a 6 UFC/ml (Tabela 6).

Resultados positivos com PCR em condições semelhantes foram obtidos por Rijpens e Herman (2004). Além de utilizarem dois passos de enriquecimento, o primeiro não muito seletivo para recuperar as bactérias estressadas, esses autores também utilizaram a separação imunomagnética para, então, fazer a amplificação por PCR.

Tabela 6: Comparação dos métodos Convencional e PCR na detecção de *L. monocytogenes* experimentalmente inoculada em leite cru com baixa população microbiana, submetido a diferentes níveis de contaminação

Repetição	Contagem microbiana do leite cru	Diluições	Inóculo de <i>L. monocytogenes</i>	Convencional			PCR		
				A*	B*	C*	A*	B*	C*
1	Contagem Padrão em Placas 3 x 10 ³ UFC/ml	10 ⁻⁷	Incontável	+	+	+	-	-	-
		10 ⁻⁸	61 UFC	+	+	+	-	-	-
		10 ⁻⁹	8 UFC	+	+	+	-	-	-
		10 ⁻¹⁰	2 UFC	-	-	+	-	-	-
		10 ⁻¹¹	0 UFC	-	-	-	-	-	-
2	Contagem Padrão em Placas 1,7 x 10 ⁵ UFC/ml	10 ⁻⁷	Incontável	+	+	+	-	-	-
		10 ⁻⁸	35 UFC	+	+	+	-	-	-
		10 ⁻⁹	2 UFC	+	+	+	-	-	-
		10 ⁻¹⁰	0 UFC	-	-	-	-	-	-
		10 ⁻¹¹	0 UFC	-	-	-	-	-	-
3	Contagem Padrão em Placas 2 x 10 ³ UFC/ml	10 ⁻⁷	Incontável	+	+	+	-	-	-
		10 ⁻⁸	45 UFC	+	+	+	-	-	-
		10 ⁻⁹	6 UFC	+	+	+	-	-	-
		10 ⁻¹⁰	0 UFC	-	-	-	-	-	-
		10 ⁻¹¹	0 UFC	-	-	-	-	-	-
4	Contagem Padrão em Placas 6 x 10 ¹ UFC/ml	10 ⁻⁷	Incontável	-	-	-	-	-	-
		10 ⁻⁸	0 UFC	-	-	-	-	-	-
		10 ⁻⁹	0 UFC	-	-	-	-	-	-
		10 ⁻¹⁰	0 UFC	-	-	-	-	-	-
		10 ⁻¹¹	0 UFC	-	-	-	-	-	-

* A, B e C: triplicatas para cada repetição

+: positivo após incubação a 30°C/48 h em meio de enriquecimento (LEB)

-: negativo após incubação a 30°C/48 h em meio de enriquecimento (LEB)

Após 48 horas de incubação das placas de Oxford e PALCAM, inoculada por esgotamento a partir do meio LEB inoculado com as diferentes diluições, foram feitas a extração de DNA (item 4.3.3) e a reação de PCR das colônias suspeitas. Todas as colônias suspeitas apresentaram resultado positivo. As bandas no gel de agarose

diretamente das colônias suspeitas podem ser visualizadas na Figura 6. Com o DNA puro, as condições de amplificação foram adequadas, conforme descrito por Novga et al. (2000). Não houve diferença de intensidade das bandas com maior (45 UFC/ml) e menor (6 UFC/ml) contaminação.

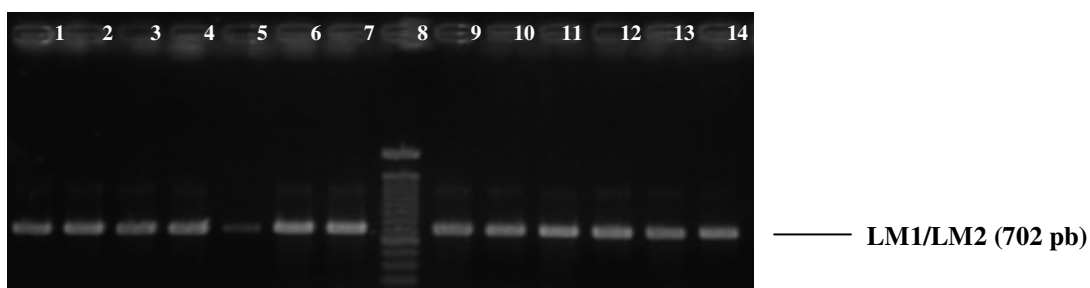


Figura 6: PCR realizado com DNA extraído diretamente de colônias suspeitas crescidas nas placas de TSYEA. Canaletas 1, 2 e 3: contaminação inicial de 45 UFC/ml; 4-7, 9-13: contaminação inicial de 6 UFC/ml; 14: controle positivo da reação; 8: marcador de peso molecular (100 pb)

A presença de outros microrganismos pode ter inibido a multiplicação de *L. monocytogenes* e, assim, ela não pôde ser detectada pela reação de PCR, por não estar na concentração mínima já antes comentada de 10^5 UFC/ml (Guilbaud et al., 2005). Em um experimento em que a bactéria foi adicionada ao leite e o DNA extraído por lise térmica, imediatamente após a inoculação, o limite de detecção por PCR foi de 5 UFC/ml de leite (Aslam et al., 2003).

Componentes dos alimentos, meios de cultura e reagentes utilizados na extração de DNA de *L. monocytogenes* podem inibir a reação de PCR, diminuindo assim a sensibilidade e gerando resultados falso-negativos (Fluit, et al., 1993; Novga et al., 2000; Lázaro et al., 2005). Segundo Aslam et al., 2003, a gordura do leite pode inibir ou dificultar a extração de DNA e a PCR. O ensaio com leite autoclavado foi realizado com leite desnatado, enquanto que nos demais, utilizou-se leite integral.

Alguns autores atribuem a dificuldade de detecção de *L. monocytogenes* utilizando PCR ao fato de o meio de enriquecimento de *Listeria* conter inibidores da *Taq polymerase* (Fluit, et al., 1993; Manzano et al., 1998). Khan et al. (1998) demonstraram que certos inibidores presentes no leite como por exemplo a gordura, podem interferir com a reação de PCR quando as bactérias crescem no leite.

A diminuição da sensibilidade da reação de PCR quando a bactéria é incubada em leite durante a noite pode ser devido à lise insuficiente da bactéria após crescer no leite e conseqüente quantidade insuficiente de DNA. A razão da lise incompleta pode ser

atribuída à gordura do leite, que cobre a superfície bacteriana, dificultando a lise celular (Aslam et al., 2003). Essa pode ser uma explicação para a não amplificação dos fragmentos de DNA nos ensaios em que foi utilizado leite integral.

5.5 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA PCR EM DETECTAR *L. monocytogenes* EM LEITE CRU COM ALTA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA INICIAL

As três repetições do experimento com leite de alta contaminação apresentaram resultados semelhantes ao ensaio com leite de baixa contaminação inicial: não foi possível detectar *L. monocytogenes* por PCR em nenhuma diluição e com nenhum dos dois métodos de extração de DNA. A sensibilidade de detecção de *L. monocytogenes* pela metodologia convencional variou de 189 a 7 UFC/ml (Tabela 7). Observou-se uma menor sensibilidade de detecção também da metodologia convencional, quando o leite utilizado tinha uma alta contaminação microbiana.

Colônias suspeitas que cresceram nas placas de Oxford e PALCAM foram repicadas em ágar TSYEA. A partir deste meio foi realizada a extração de DNA (item 4.3.3) da colônia para a confirmação da identidade da bactéria.

Como ilustrado na Figura 7, as bandas formadas no gel de agarose são nítidas. O método de lise térmica diretamente da colônia é um bom método de extração de DNA para a confirmação de colônias suspeitas, substituindo uma bateria de testes fenotípicos mais demorados e menos acurados.

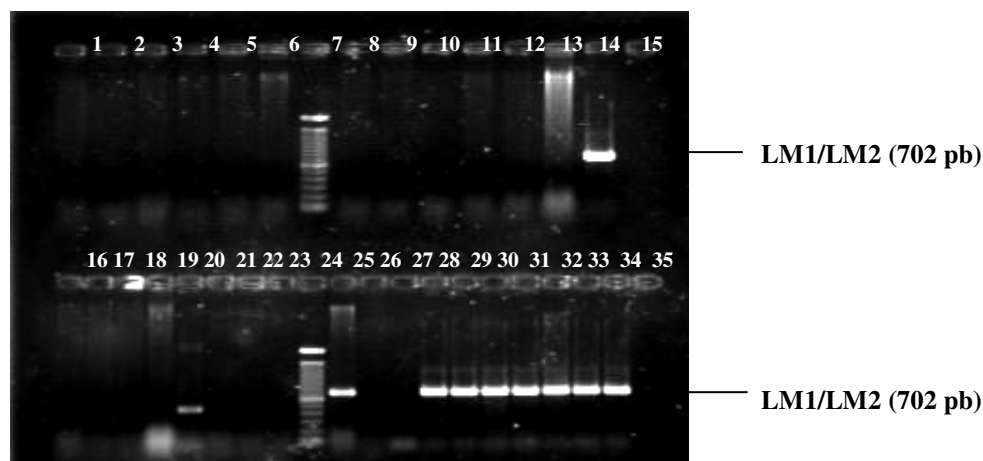


Figura 7. Reação de PCR com os oligonucleotídeos LM1/LM2 após a etapa de enriquecimento a 30°C/48 h com diferentes diluições de *L.monocytogenes*, com DNA extraído pelo método utilizando fenol-clorofórmio e reação de PCR realizada com DNA extraído diretamente de colônias suspeitas. Canaletas 1 a 9: extração de DNA do leite contaminado com número incontável de *L. monocytogenes*; 7 e 24: marcador de peso molecular (100 pb); 10 e 11: extração de DNA do leite contaminado com 70 UFC/ml; 12 e 13: extração de DNA do leite contaminado com 8 UFC/ml; 14 e 25: controles positivos; 15 e 35: vazios; 16 ao 23: extração de DNA do leite não inoculado com *L. monocytogenes*; 26 e 27: controles negativos; 28 a 32: extração de DNA direto da colônia/contaminação inicial incontável; 33 e 34: extração de DNA direto da colônia com contaminação inicial de 70 UFC/ml

Tabela 7: Comparação dos métodos Convencional e PCR na detecção de *L. monocytogenes* inoculada em leite cru com alta contaminação microbiana, após etapa de enriquecimento seletivo

Repetição	Contagem microbiana do leite cru	Diluições	Inóculo de <i>L. monocytogenes</i>	Convencional			PCR		
				A*	B*	C*	A*	B*	C*
1	Contagem Padrão em Placas	10 ⁻⁷	Incontável	+	+	+	-	-	-
		10 ⁻⁸	40 UFC	+	-	+	-	-	-
	1 x 10 ⁷ UFC/ml	10 ⁻⁹	7 UFC	+	-	+	-	-	-
		10 ⁻¹⁰	13 UFC	-	-	-	-	-	-
		10 ⁻¹¹	1 UFC	-	-	-	-	-	-
		10 ⁻¹²	0 UFC	-	-	-	-	-	-
Coliformes	10 ⁻¹²	0 UFC	-	-	-	-	-	-	
	10 ⁻¹³	0 UFC	-	-	-	-	-	-	
2	Contagem Padrão em Placas	10 ⁻⁷	Incontável	+	+	+	-	-	-
		10 ⁻⁸	189 UFC	-	-	+	-	-	-
	1 x 10 ⁷ UFC/ml	10 ⁻⁹	98 UFC	-	-	-	-	-	-
		10 ⁻¹⁰	45 UFC	-	-	-	-	-	-
		10 ⁻¹¹	19 UFC	-	-	-	-	-	-
		10 ⁻¹²	09 UFC	-	-	-	-	-	-
Coliformes	10 ⁻¹²	09 UFC	-	-	-	-	-	-	
	10 ⁻¹³	0 UFC	-	-	-	-	-	-	
3	Contagem Padrão em Placas	10 ⁻⁷	Incontável	-	+	+	-	-	-
		10 ⁻⁸	70 UFC	+	+	+	-	-	-
	5 x 10 ⁷ UFC/ml	10 ⁻⁹	8 UFC	-	-	-	-	-	-
		10 ⁻¹⁰	0 UFC	-	-	-	-	-	-
		10 ⁻¹¹	0 UFC	-	-	-	-	-	-
		10 ⁻¹²	0 UFC	-	-	-	-	-	-
Coliformes	10 ⁻¹²	0 UFC	-	-	-	-	-	-	
	10 ⁻¹³	0 UFC	-	-	-	-	-	-	

* A, B e C: triplicatas para cada repetição

+: positivo após incubação a 30°C/48 h em meio de enriquecimento (LEB)

-: negativo após incubação a 30°C/48 h em meio de enriquecimento (LEB)

As placas de Oxford apresentaram resultados positivos na leitura até mesmo nas diluições nas quais a quantidade de *L. monocytogenes* inoculada era de 2 UFC/mL. Porém, as colônias crescidas nas diluições acima de 10^{-9} não eram típicas de *Listeria* spp. Nas placas de PALCAM o mesmo não ocorreu, a maioria das colônias crescidas neste meio apresentou características de *Listeria* spp. e foram confirmadas como *L. monocytogenes*.

No presente trabalho, o ágar PALCAM mostrou-se mais seletivo que o Oxford, pois neste último, várias colônias não características de *Listeria* spp. cresceram. Segundo Pinto et al. (2001), o meio LMBA (*Listeria monocytogenes* Blood Agar) é mais específico do que o PALCAM ou Oxford para detectar *Listeria monocytogenes* em amostras de alimentos e no ambiente.

Comparando a eficiência de três ágaros seletivos, PALCAM, lítio-feniletanol-moxalactam (LPM) e ágar hemolítico ceftazidima-cloreto de lítio (HCLA), Rodrigues et al. (2003) concluíram que o HCLA foi muito superior que o PALCAM e LPM. Porém, a dificuldade de aquisição no mercado interno da colistina metanosulfonato, componente do HCLA, aliada ao seu preparo trabalhoso, podem dificultar o seu emprego na pesquisa rotineira de *L. monocytogenes*.

Quando amostras de queijos foram analisadas no Rio de Janeiro, constatou-se que a eficiência dos meios seletivos variou em função da contaminação do queijo, sendo o ágar MOX (ágar Oxford modificado) mais sensível e seletivo que o PALCAM para as amostras de queijo com elevado nível de contaminação. Portanto, quando o queijo não estava muito contaminado, ambos apresentaram a mesma eficiência (Silva et al., 1998).

No presente trabalho, resultados melhores foram obtidos quando a PCR foi feita utilizando DNA extraído diretamente da colônia suspeita em meio sólido, quando comparado com a PCR feita a partir de alíquotas do meio LEB. Rijpens e Herman (2004) fizeram observação semelhante utilizando a técnica de PCR para detectar *L. monocytogenes* em queijos artificialmente contaminados com esse microrganismo, em diferentes concentrações.

Fluit et al. (1993) desenvolveram trabalho semelhante para identificação de *L. monocytogenes*, com enriquecimento em LEB e Caldo Fraser (Oxoid), plaqueamento em ágar Oxford e PCR com oligonucleotídeos para identificação de listeriolisina O. Entretanto, a reação de PCR foi precedida de separação imunomagnética, que possibilitou a detecção da bactéria em queijos por remover substâncias inibitórias e também por aumentar a quantidade de células viáveis para a reação. Os oligonucleotídeos utilizados também se mostraram específicos no trabalho realizado, pois foram testados com diferentes bactérias como: *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri*.

Garcia (2006) conseguiu estabelecer protocolo de detecção de *Escherichia coli* O157:H7 produtora de Shiga-like toxinas utilizando PCR *multiplex*. Foi possível a utilização do protocolo em leite estéril e de baixa contaminação. Em leite com alta contaminação microbiana, os métodos de PCR e o convencional apresentaram sensibilidade reduzida. Em condições semelhantes de trabalho, foi possível detectar *Escherichia coli* O157:H7 em leite contaminado, enquanto o mesmo não ocorreu com *L. monocytogenes*. Esse fato pode ser devido à competitividade da bactéria, ou seja, *Escherichia coli* é uma bactéria mais competitiva que *L. monocytogenes*.

Considerando que o FDA possui política de tolerância zero para a presença de *Listeria monocytogenes* em alimentos, tanto a reação de PCR quanto a metodologia convencional não se mostraram eficazes na detecção de baixo número de *L. monocytogenes* em leite com alta contaminação.

6 CONCLUSÕES

O objetivo geral deste trabalho, que era detectar *L. monocytogenes* inoculada em leite, após um período de enriquecimento seletivo, por meio da técnica de PCR, não foi alcançado. Somente o ensaio que utilizou leite desnatado estéril apresentou resultados positivos, com a detecção da bactéria após 48 horas de incubação em meio de enriquecimento seletivo. Porém, os resultados não se repetiram quando utilizou-se leite cru integral.

Foi padronizada uma PCR com culturas puras de *L. monocytogenes* utilizando os oligonucleotídeos LM1/LM2 e uma PCR *multiplex* com os oligonucleotídeos IAP1/IAP2 e LMA/LMB.

Os três pares de oligonucleotídeos testados apresentaram boa eficiência de amplificação, pois detectaram todas as amostras de *L. monocytogenes*. Os oligonucleotídeos LM1/LM2 foram também 100% específicos, pois só amplificaram amostras de *L. monocytogenes*.

Só foi possível avaliar a sensibilidade da reação de PCR na identificação de *L. monocytogenes* no ensaio que utilizou leite desnatado estéril. A detecção foi possível até 1 UFC/ml.

Foi possível reduzir o tempo de identificação de *L. monocytogenes* após seu isolamento em meio seletivo-diferencial, substituindo os testes fenotípicos de identificação pela reação de PCR realizada com DNA extraído por lise térmica diretamente da colônia suspeita.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, P.F.; ALMEIDA, R.C. Métodos de detecção e mecanismos de virulência de *Listeria monocytogenes*. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos BOL. SBCTA**, v.37, n.2, p.136-145, 2003.

ASLAM, M.; HOGAN, J.; SMITH, K.L. Development of a PCR-based assay to detect Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in milk. **Food Microbiology**, v.20, p. 345-350, 2003.

AZNAR, R.; ALARCÓN, B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.958-966, 2003.

BARROW, G.I.; FELTHAM, R.K.A. **Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University, 1993. 331p.

BEARNS, R.E.; GIRARD, K.F. The Effect of pasteurization on *Listeria monocytogenes*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.4, p.55-61, 1958.

BILLE, J.; ROCOURT, J.; SWAMINATHAN, B. *Listeria* and *Erysipelothrix* In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**, v.1, 8ed., p.461-471, 2003.

BORDER, P.M.; HOWARD, J.J.; PLASTOW, G.S.; SIGGENS, K.W. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v.11, p.158-162, 1990.

- BORGES, M.F.; SIQUEIRA, R.S.; BITTENCOURT, A.M.; VANETTI, M.C.D.; GOMIDE, L.A.M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami. **Revista de Microbiologia**, v.30, n.4, p.362-364, 1999.
- BRADSHAW, J.G.; PEELER, J.T.; CORWIN, J.J.; HUNT, J.M.; TIERNEY, J.T.; LARKIN, E.P.; TWEDT, R.M. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in Milk. **Journal of Food Protection**, v. 48, n. 9, p. 743-745, 1985.
- BROWN, T. A. *Clonagem gênica e análise de DNA* 4 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2003. 376 p.
- DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**, Washington D.C.: ASM Press, 1997, p. 337-352.
- FACKLAM, R. R.; ELLIOTT, J. A. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, Gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 479-495, 1995.
- FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*: a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v.55, n.3, p.476-511, 1991.
- FLOWERS, R. S.; ANDREWS, W.; DONNELLY, C. W.; KOENIG, E. Pathogens in milk and milk products. In: MARSHALL, R. T. (Ed.). **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 16. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1992. p. 103-212.
- FLEMING, D.W.; COCHI, S.L.; MACDONALD, K.L.; BRONDUM, J.; HAYES, P.S.; PLIKAYTIS, B.D.; HOLMES, M.B.; AUDURIER, A.; BROOME, C.V.; REINGOLD, A.L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **The New England Journal of Medicine**, v.312, n.7, p.404-407, 1985.
- FLUIT, A.C.; TORENSMA, R.; VISSER, M.J.C.; AARSMAN, C.J.M; POPPELIER, M.J.J.G.; KELLER, B.H.I.; KLAPWIJK, P.; VERHOEF, J. Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the Magnetic Immuno-Polymerase Chain reaction assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1289-1293, 1993.
- FOOD safety and foodborne illness. Word Health Organization, Janeiro de 2002, OMS. Disponível em: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en. Acesso em 23 nov. 2006.
- FURRER,B.; CANDRIAN,U.; HOEFELEIN,C.; LUETHY,J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. **Journal of Applied Microbiology**, v.70, p.372-379, 1991.
- GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n.1, p. 1-15, 2007.
- GARCIA, P. M. *Detecção de Escherichia coli O157:H7 em leite por um método convencional e por reação em cadeia da polimerase (PCR)*. 2006. 34f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P.M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, pv.29, n.5, p. 851-875, 2005.

- GRAY, M.L.; KILLINGER, A.H. *Listeria monocytogenes* and Listeric infections. **Bacteriology Reviews**, v.30, n.2, p. 309-382, 1966.
- GUILBAUD, M.; COPPET, P.; BOURION, F.; RACHMAN, C.; PRÉVOST, H.; DOUSSET, X. Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* in biofilms by Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 2190-2194, 2005.
- GITTER, M.; BRADLEY, R.; BLAMPIED, P.H. *Listeria monocytogenes* infection in bovine mastitis. **The Veterinary Record**, v.107, p.390-393, 1980.
- HOFER, E.; NASCIMENTO, R.S.; OLIVEIRA, M.A. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.2, p.173-177, 1998.
- HOFER, C.B.; MELLES, C.E.A.; HOFER, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 6, p. 375-377, 1999.
- HOFER, E.; RIBEIRO, R.; FEITOSA, D.P. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.5, p.615-620, 2000.
- HOFER, E.; REIS, C.M.F. Species and serovars of *Listeria* isolated from sick and clinically healthy animals in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 79-83, 2005.
- HU, Y.; ZHANG, Q.; MEITZLER, J.C. Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, n.6, p. 867-876, 1999.
- JERSEK, B., TCHERNEVA, E., RIJPENS, N., HERMAN, L. Repetitive element sequence-based PCR for species and strain discrimination in the genus *Listeria*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 55-60, 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, n. 1, p. 103-109, 1999.
- KELLS, J.; GILMOUR, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, n.2, p 67-174, 2004.
- KHAN, M. A.; KIM, C. H.; KAKOMA, A. I.; MORIN, D. E.; HANSEN, R. D.; HURLEY, W. L.; TRIPATHY, D. N.; BAEK, B. K. Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by use of polymerase chain reaction analysis. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, p. 807-813, 1998.
- LÁZARO, D. R.; PLA, M.; SCORTTI, M.; MONZÓ, H. J.; VASQUES-BOLAND, J. A. A novel Real-Time PCR for *Listeria monocytogenes* that monitors analytical performance via an internal amplification control. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 9008-9012, 2005.
- LENNETTE, E.H.; SPAUDING L.H., TRUANT J. P. **Manual of Clinical Microbiology**. 4 ed. Cap. 19, p. 205-208, American Society for Microbiology, 1985.
- MANZANO, M.; COCOLIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. A rapid method for the identification and partial serotyping

of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and restriction enzyme analysis. **International Journal of Food Microbiology** v.42, n.3, p. 207-212, 1998.

MURRAY, E.G.D.; WEBB, R.E.; SWANN, M.B.R. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. **Journal Pathology Bacteriology**, v.29, p.407-439, 1926.

NIEDERHAUSER, C.; HOFELEIN, C.; LUTHY, J.; KAUFMANN, U.; BÜHLER, H.-P.; CANDRIAN, U. Comparison of "Gen-Probe" DNA probe and PCR for detection of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated soft cheese and semi-soft cheese. **Research in Microbiology**, v.144, p.47-54, 1993.

NUNES, E.L.C.; SANTOS, K.R.N.; MONDINO, P.J.J.; BASTOS, M.C.F.; GIAMBIAGI-DE-MARVAL, M. Detection of ileS-2 gene encoding mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR. **Diagnostic Microbiology Infectious Diseases**, v.34, p.77-81, 1999.

OLIVEIRA, A. N. *Bactérias do gênero Listeria em leite e derivados no comércio varejista de Goiânia – Goiás*. 1993. 51f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PADILHA, M.R.F.; FERNANDES, Z.F.; LEAL, T.C.A.; LEAL, N.C.; ALMEIDA, A.M.P. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade de Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.2 p.167-171, 2001.

PELISSER, M. R.; MENDES, S. D. C.; SUTHERLAND, A. D.; BATISTA, C. R. V.

Detection of *Listeria* species in refrigerated chicken carcasses using clearview and a modified conventional culture method. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.2, p.113-116, 2001.

PINI, P.N.; GILBERT, R.J. A comparison of two procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from raw chickens and soft cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v.7, p.331-337, 1988.

PINTO, M.; BURRI, S.; MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P.A. Comparison of Oxford Agar, PALCAM and *Listeria monocytogenes* Blood Agar for the recovery of *L. monocytogenes* from foods and environmental samples. **Food Control**, v.12, n.8, p.511-514, 2001.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Philadelphia: Mosby, 1994. 648 p.170-174.

RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.R.. **Microbiologia Prática: roteiro e manual**. São Paulo: Atheneu, 1998. 112 p.

RIJPENS, N.; HERMAN, L. Comparison of selective and nonselective primary enrichments for the detection of *Listeria monocytogenes* in cheese. **Journal of Food Microbiology** v.94, n. 1, p. 15-22, 2004.

ROCOURT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; Montville, T.J. (Eds). *Food Microbiology: Fundamental and Frontiers*. Washington: ASM, 1997. P. 337-352.

RODRIGUES, D.A.; FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T. Avaliação da eficiência de três ágaros seletivos no isolamento de *Listeria monocytogenes*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23 suplemento p. 87-92, 2003.

SALAMANO, R.; Braselli, A.; Hoppe, A.; Monteghirfo, R.; Silva, T. Neurolisteriosis in adults: report of six clinical cases. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria.**, São Paulo, v. 63, n. 4, p. 1063-1069, 2005.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. **Bacterial Pathogenesis: a Molecular Approach.** Washington: ASM, 1994. 418 p.

SHEN, Y.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; CRIFE, J.; CONWAY, W.; MENG, J. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat foods in Florida **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5073-5076, 2006.

SCHWAB, J.P.; EDELWEISS, M.I.A. Identificação imuno-histoquímica de *Listeria monocytogenes* em placentas fixadas em formol e embebidas em parafina. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.25, n.7, p.501-505, 2003.

SEELIGER, H.P.R. Modern taxonomy of the *Listeria* group-relationship to its pathogenicity. **Clinical and Investigative Medicine**, n.7, p.217-221, 1984.

SILVA, M.C.D.; VILARDI, T.C.C.; TIBANA, A. Avaliação para detecção de *Listeria* em queijos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.2, p.150-155, 1998.

SILVA, I.M.M.; ALMEIDA, R.C.C.; ALVES, M.A.O.; ALMEIDA, P.F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, n.3, p. 241-248, 2003.

SILVA, W.P.; LIMA, A.S.; GANDRA, E.A.; ARAÚJO, M.R.; MACEDO, M.R.P.; DUVAL, E.H. *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.3, p.911-916, 2004.

TOYOSHIMA, M.T.K., APANAVICIUS, A.; SOEIRO, A.M. *Listeria monocytogenes* peritonitis in cirrhotic patients: first description in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 5, p. 291-293, 2006.

VITAS, A.I.; AGUADO, V.; JALON, I.G. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, n. 3, p. 349-356, 2004.