

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Listeria* sp.
PROVENIENTE DE HORTALIÇAS FOLHOSAS MINIMAMENTE
PROCESSADAS COMERCIALIZADAS EM PORTO ALEGRE - RS**

Sylvia Elisa Frizzo Verdin
Engenheira de Alimentos – UFC

Porto Alegre

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Listeria* sp.
PROVENIENTE DE HORTALIÇAS FOLHOSAS MINIMAMENTE
PROCESSADAS COMERCIALIZADAS EM PORTO ALEGRE - RS**

Sylvia Elisa Frizzo Verdin
Engenheira de Alimentos – UFC

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
na área de Microbiologia Agrícola
Orientador: Gertrudes Corção

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Abril, 2006

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, minha força vital e amigo sempre presente.

À Dra. Gertrudes Corção pela orientação, incentivo e paciência, fundamentais para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul através do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela oportunidade proporcionada.

Aos professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Aos colegas do mestrado e laboratório de bacteriologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde pelo apoio e carinho.

À Silvia Regina Pavan da Silva, Dariane Castro Pereira e Aline Modelski Schatkoski pela amizade, apoio e ajuda, importantes na realização deste trabalho.

À Roseli Alves de Sousa, Neuma Maria Pinheiro e professora Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo pela amizade e incentivo para obtenção deste título.

Aos meus pais e irmãos pelo amor e incentivo sempre.

Ao meu marido pelo amor, incentivo e paciência, fundamentais nesses dois anos.

Aos CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que colaboraram durante a realização deste trabalho.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Listeria* sp. PROVENIENTE DE HORTALIÇAS FOLHOSAS MINIMAMENTE PROCESSADAS COMERCIALIZADAS EM PORTO ALEGRE – RS¹.

Autor: Sylvia Elisa Frizzo Verdin
Orientadora: Prof^ª Dr^ª Gertrudes Corção

RESUMO

Hortaliças minimamente processadas passam por etapas como: lavagem, seleção, descasque, corte e sanificação e, depois de embaladas, são armazenadas sob refrigeração. No entanto, se não houver cuidado na procedência da matéria-prima, no processamento e na higienização, há o risco de se encontrar bactérias patogênicas, entre elas *Listeria monocytogenes*, a qual pode crescer à temperatura de refrigeração. A listeriose manifesta-se como um resfriado, podendo progredir para meningite, meningoencefalite, septicemia e aborto. Este trabalho teve por objetivo verificar a ocorrência de *Listeria* sp. Em hortaliças folhosas minimamente processadas comercializadas em Porto Alegre – RS e verificar a relação genética entre os isolados. Saladas folhosas minimamente processadas foram coletadas mensalmente em supermercados locais. Destas amostras foram transferidos 25g para Caldo de Enriquecimento de *Listeria*, seguido de semeadura em ágar PALCAM e Oxford Modificado. Foi realizado isolamento e identificação das espécies das colônias características. Dos isolados identificados foi feita a amplificação da região intergênica 16S-23S do rDNA para verificação da variabilidade genética. *Listeria* sp. foi encontrada em 23 das 52 amostras, sendo *L. monocytogenes* encontrada em 7 amostras. A presença de *L. monocytogenes* é preocupante, pois estes produtos são consumidos sem nenhum tratamento pelo consumidor. Através da amplificação da região intergênica 16S-23S do rDNA de *Listeria* sp., observou-se grande diversidade entre os 164 isolados, gerando 44 padrões, e linhagens distintas nas diferentes origens das amostras.

1 Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Agrícola. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (78p.) Abril, 2006.

INCIDENCE AND GENETIC CHARACTERIZATION OF *Listeria* sp. FROM MINIMALLY PROCESSED VEGETABLES IN PORTO ALEGRE – RS¹.

Author: Sylvia Elisa Frizzo Verdin

Advisor: Prof^a Gertrudes Corção, PhD

ABSTRACT

Processed vegetables go through many steps like washing, selection, peeling, cutting and disinfection, and after being packed they are kept under refrigeration. However, if there is no care about the raw material origin and at the processing and disinfection steps, there is a chance of finding pathogenic bacterias, like *Listeria monocytogenes*, which can grow at low temperatures. The symptoms of listeriosis are similar to a cold and they can progress to meningitis, meningoencephalitis, septicemia and abortion. The aim of the present work was to verify the incidence of *Listeria* sp. in ready to use processed vegetables and to analyze the genetic relationship among the isolates. Ready to use salads were sampled at local supermarkets every month and analyzed by inoculating them on *Listeria* Enrichment Broth and afterwards seeding on two selective media, Palcam and Modified Oxford Agar. The characteristics colonies were isolated and identified until species level. The intergenic region 16S-23S rDNA of all identified isolates was amplified in order to verify their genetic variability. *Listeria* sp. was found in 23 of the 52 samples of ready to use salads, *L. monocytogenes* was found in seven samples. The presence of *L. monocytogenes* is also a health concern, once these salads are consumed without a previous treatment. The amplification of the intergenic region showed a great genetic diversity among the 164 isolates, once it has generated 44 different patterns, and it has also proved to be useful in epidemiologic studies, once the same pattern could be observed at different salad and at different time.

¹Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (78p.) April, 2006.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Hortaliças Folhosas Minimamente Processadas.....	3
2.2. Hortaliças Folhosas Minimamente Processadas e Fontes de Contaminação.....	4
2.3. Armazenamento e Conservação de Hortaliças Folhosas Minimamente Processadas.....	7
2.4. O Gênero <i>Listeria</i> e Listeriose.....	9
2.5. <i>Listeria</i> sp. em Hortaliças Folhosas Minimamente Processadas.....	12
2.6. Métodos Moleculares para Tipificação.....	14
2.7. Região Intergênica 16S-23S do rDNA.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Amostras.....	20
3.2. Coleta e Transporte das Amostras.....	20
3.3. Análises Microbiológicas.....	21
3.3.1. Preparação das Amostras.....	21
3.3.2. Enriquecimento Seletivo, Semeadura em Meio Sólido Seletivo Diferencial e Isolamento.....	21
3.3.3. Purificação.....	22
3.3.4. Confirmação das Colônias Características de <i>Listeria</i> sp. e Identificação em Gênero e Espécie.....	22
3.3.4.1. Identificação do Gênero.....	23
a) Coloração de Gram.....	23
b) Catalase.....	23
c) Crescimento em Agar Tríplice Açúcar Ferro (TSI).....	23
d) Teste de Vermelho de Metila (VM) e Voges-Proskauer (VP).....	23
e) Teste de Motilidade com Cloreto de Trifeniltetrazólio.....	24
3.3.4.2. Identificação das Espécies.....	25
a) Teste de β -hemólise.....	25
b) Fermentação de Açúcares.....	25
c) CAMP-teste.....	25
d) Redução de Nitrato.....	26
3.4. Análises Moleculares.....	26
3.4.1. Extração do DNA Cromossomal dos Isolados de <i>Listeria</i> spp.....	26
3.4.2. Amplificação do Fragmento 16S-23S do rDNA.....	28
3.4.3. Análise dos Fragmentos Amplificados.....	29
3.4.4. Análise Estatística.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1. Presença de <i>Listeria</i> sp. em amostras de Hortaliças Folhosas Minimamente Processadas.....	30

4.2. Isolamento e Distribuição de <i>Listeria</i> sp. nos Meios Seletivos Agar Oxford Modificado (MOX) e Agar Palcam (PAL).....	36
4.3. Identificação pelo api® <i>Listeria</i>	37
4.4. Caracterização Molecular.....	38
4.4.1. Análise dos Fragmentos Amplificados da Região Intergênica 16S-23S do rDNA.....	38
4.4.2. Análise do Dendrograma.....	48
5. CONCLUSÕES.....	53
6. PERSPECTIVAS.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
8. APÊNDICES.....	65
8.1. Meios de Cultivo.....	66
8.1.1. Agar Conservação.....	66
8.1.2. Caldo Vermelho de Metila – Voges Proskauer.....	66
8.1.3. Caldo Púrpura Base.....	67
8.1.4. Caldo Nitrato.....	67
8.2. Relação dos isolados, alguns testes bioquímicos, código api® <i>Listeria</i> , padrão e código do dendrograma.....	68
8.3. Matriz do Coeficiente de Similaridade.....	77
9. VITA.....	78

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1	Características das espécies de <i>Listeria</i>	10
TABELA 2	Origem, marca, tipo de salada e composição das amostras analisadas.....	21
TABELA 3	Distribuição das espécies de <i>Listeria</i> sp. isoladas por coleta, marca e tipo de salada.....	31
TABELA 4	Distribuição das espécies de <i>Listeria</i> sp. e <i>Jonesia</i> isoladas por marca de salada.....	34
TABELA 5	Padrões encontrados na amplificação da região intergênica 16S-23S do rDNA dos 164 isolados de <i>Listeria</i> sp. e <i>Jonesia</i>	39
TABELA 6	Distribuição dos padrões por espécie, marca, origem da amostra e estação do ano.....	41

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1	Arranjo dos genes 16S, 23S e 5S do operon e suas regiões espaçadoras (ITS).....	18
FIGURA 2	Motilidade característica de <i>Listeria</i> spp. no meio SIM com 0,005% de Cloreto de Trifeniltetrazólio.....	24
FIGURA 3	Padrões de fragmentos da amplificação da região intergênica 16S-23S do rDNA de isolados de <i>Listeria</i> sp.....	40
FIGURA 4	Dendrograma baseado na análise da amplificação intergênica 16S-23S do rDNA dos isolados de <i>Listeria</i> e <i>Jonesia</i>	49

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% = percentual
® = marca registrada
(-) = negativo
(+) = positivo
 α = alfa
 β = beta
 μg = micrograma
 μM = micromolar
 μL = microlitro
ATCC = American Type Culture Collection
 $^{\circ}\text{C}$ = graus Celsius
DNA = ácido desoxirribonucléico
g = força gravitacional
g = grama
ITS = região intergênica
L = litro
M = molar
mg = miligrama
mL = mililitro
mM = milimolar
mm = milímetro
 n° = número
ng = nanograma
pb = pares de base
PCR = reação em cadeia da polimerase
PFGE = eletroforese em campo pulsado
ppm = parte por milhão
RAPD = polimorfismo do fragmento amplificado ao acaso
rDNA = DNA ribossomal
RFLP = polimorfismo do fragmento de restrição
sp. = espécie
spp. = espécies
U = unidade
UFC = unidades formadoras de colônia
V/cm = volts por centímetro
v/v = volume por volume

1. INTRODUÇÃO

A procura por produtos “prontos para consumo” tem aumentado nos últimos anos, tendo em vista sua praticidade. Se, por um lado, esses produtos trazem facilidade e vem ao encontro dos anseios modernos, por outro, podem também trazer riscos aos consumidores, uma vez que esses alimentos não sofrem um tratamento pelo consumidor antes de serem consumidos.

Dentre os produtos prontos para consumo estão as hortaliças folhosas, cujo consumo diário é recomendado. Após tratadas e embaladas, elas são mantidas sob refrigeração, porém, isso, além de não eliminar uma contaminação resultante de um processamento e higienização inadequados, potencializa o crescimento de psicrotróficos, dentre os quais encontra-se a *Listeria monocytogenes*, um patógeno para humano.

A listeriose está associada a alimentos frescos processados, prontos para consumo, principalmente aqueles mantidos à temperatura de refrigeração. Assim, o risco desta infecção aumenta à proporção da produção crescente desse tipo de alimento, fato que tem despertado a preocupação dos órgãos de saúde pública.

A pesquisa da ocorrência de *L. monocytogenes* em hortaliças folhosas é um dado importante por ser um produto bastante consumido pela população em geral, sendo que seu consumo pela população susceptível à

listeriose (mulheres grávidas, idosos e adultos com sistema imune comprometido) pode levar à morte.

Uma vez presente nas hortaliças minimamente processadas, *Listeria* sp. permanece sem efeito inibitório em seu crescimento durante o armazenamento. Ela pode crescer à temperatura de refrigeração e em atmosfera modificada (baixa concentração de oxigênio).

Como a contaminação das hortaliças pode ser gerada por várias fontes (água, solo, adubos, manipulador, ambiente de processamento, etc), tanto antes quanto após o processamento, são empregados métodos moleculares para verificação de similaridade genética entre os isolados, com relação a linhagens envolvidas em surtos, podendo auxiliar na identificação das fontes de contaminação na linha de processamento.

Este trabalho teve por objetivo verificar a ocorrência de *Listeria* sp. em hortaliças folhosas minimamente processadas e caracterizar geneticamente os isolados quanto à similaridade genética, origem e sazonalidade através da amplificação da região intergênica 16S – 23S do rDNA.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Hortaliças Folhosas Minimamente Processadas

As hortaliças folhosas estão entre os alimentos mais consumidos pela população brasileira, sendo recomendado o seu consumo diário, praticamente sem limitação quantitativa. A demanda por frutos e hortaliças frescos, associada à conveniência da vida atual, está incentivando o interesse por produtos minimamente processados (Rosa & Carvalho, 2000). O conceito de comercialização de vegetais minimamente processados, “fresh cut”, tem sido aplicado comercialmente a uma ampla variedade de vegetais, sendo submetidos a algum tipo de modificação em sua condição natural, mas que apresentam qualidade semelhante à do produto fresco.

O processamento mínimo inclui todas as operações de limpeza, lavagem, seleção, descascamento, corte, embalagem e armazenamento, os quais agregam valor ao produto (Sarantópoulos et al., 1996). A popularidade desses produtos deve-se à facilidade de preparo, exigida cada vez mais, pois já vêm lavados, cortados e limpos, o que também implica na diminuição da geração de lixo doméstico (Barriga et al., 1991). Porém, os alimentos minimamente processados são altamente perecíveis e necessitam de cuidados especiais e adoção de estratégias para o prolongamento de sua vida de prateleira (Maistro, 2001).

2.2. Hortaliças Folhosas Minimamente Processadas e Fontes de Contaminação

A presença de microrganismos em verduras pode refletir a qualidade sanitária das etapas de sua preparação e as condições microbiológicas do produto cru, antes de seu processamento (Kaneko et al., 1999b). Entre os requisitos que devem apresentar os alimentos para que sejam considerados de boa qualidade higiênica encontra-se o de estarem isentos de microrganismos patogênicos, ou que estes se encontrem em quantidades que não ofereçam riscos ao consumidor (Jay, 2005). A contaminação pode ocorrer sem qualquer alteração ou perda da qualidade sensorial do produto (Thunberg et al., 2002).

A pré-seleção de matérias primas, a adoção de boas práticas de fabricação (BPF) e o controle enzimático e microbiológico são de fundamental importância para a qualidade do produto (ICMSF, 1997). A esterilidade não é conseguida, porém os tratamentos alteram de tal forma a microbiota natural, que pode-se atingir a estabilidade do produto por um tempo determinado (De Roever, 1998).

O solo, a água, o ar, os insetos e outros animais contribuem com a microbiota inicial dos vegetais. Uma variação considerável da carga microbiana pode ser atribuída à quantidade de terra que permanece aderida ao vegetal na colheita. Os patógenos geralmente encontrados são aqueles inseridos à microbiota do vegetal por dejetos de animais utilizados como fertilizantes ou a água contaminada também por dejetos (Koseki & Isobe, 2005). Porém, vegetais não adubados com dejetos podem ainda veicular microrganismos patogênicos, através de manipulação incorreta, sem condições higiênicas e

lavagem adequada. Nos campos de hortaliças que são consumidas somente após cocção, se permite a irrigação com água residual. Porém esta irrigação deve ser feita até, no máximo, quatro semanas antes da colheita. Isso porque alguns microrganismos patogênicos, de origem fecal, enterobactérias, podem permanecer por até cinco semanas no solo (Müller, 1981).

Uma das etapas mais precárias na pós-colheita e transporte até a planta de processamento é o armazenamento em recipientes inadequados como caixa de madeira ou de papelão, sacos, cestas de bambu, os quais permitem que haja esmagamentos e perfurações dos vegetais (Allende et al., 2004; ICMSF, 1997). Como consequência dessas práticas alguns nutrientes são liberados, favorecendo o crescimento microbiano, e é formada uma “porta de entrada” aos microrganismos, causando deterioração (De Roever, 1998). A prática de aproveitamento de vegetais em más condições para a elaboração de saladas também influencia no aumento do número de microrganismos no produto final.

Os microrganismos também podem originar-se através de máquinas e lâminas cortadoras, esteiras de transporte, etc. Como as indústrias utilizam vários tipos de vegetais, torna-se difícil evitar uma contaminação cruzada (Kaneko et al., 1999a). A contribuição de cada uma dessas fontes dependerá da frequência e eficácia da limpeza das peças e equipamentos (Gleeson & O’Beirne, 2005; Maistro, 2001), que, por sua vez, se torna fator importante, pois a contaminação através de biofilmes destes aparelhos também pode acontecer. Esses biofilmes podem proteger diversos microrganismos, entre eles patógenos, contra a ação de sanitizantes (Buck et al., 2003).

A lavagem pode eliminar 90% da microbiota superficial, porém a água residual nos vegetais pode permitir a multiplicação dos microrganismos presentes (De Roever, 1998). A água de lavagem, não sendo potável, pode adicionar microrganismos aos vegetais (ICMSF, 1997). A utilização de cloro na água de lavagem é um procedimento importante. Este é comumente usado na prevenção de contaminação cruzada e aumento da eficiência na lavagem (De Roever, 1998). Porém, apesar da eficácia na redução de microrganismos, o cloro na concentração de 200 ppm não demonstrou ser completamente efetivo (Maistro, 2001). Portanto, devem ser observados a concentração de cloro e o tempo de contato, os quais influenciam diretamente na redução de microrganismos.

Assim, a manipulação dos alimentos de forma incorreta, a água de irrigação contaminada, o uso de dejetos de animais como fertilizante, a lavagem inadequada na pós-colheita, práticas de desinfecção ineficazes, e empacotamento impróprio são alguns dos fatores que podem contribuir na contaminação de microrganismos desde o campo até a mesa do consumidor (Madden, 1992). Esses procedimentos podem influenciar tanto na manutenção da microbiota natural, quanto no aparecimento e desenvolvimento de patógenos (Thunberg et al., 2002; Lin et al., 1996). Francis et al. (1999) demonstraram que vegetais manipulados, lavados e cortados estão mais propícios à contaminação, até mesmo por patógenos, que vegetais não processados. Também Ayçiçek et al. (2004) demonstraram que, em saladas, mais do que em outros alimentos, a etapa da manipulação é a mais importante

no processamento, visto que elas são usualmente preparadas sem um cozimento.

Antigamente, não havia tanta preocupação, por parte dos órgãos de saúde pública, quanto ao consumo de alimentos frescos. Eles eram considerados seguros, pois eram tratados (lavados e higienizados) pelo consumidor antes de seu consumo (Berbari et al., 2001; Lin et al., 1996). Atualmente, com a tendência ao consumo de hortaliças minimamente processadas, ocorre uma preocupação, pois esse alimento é bastante manipulado e consumido, após um tempo de armazenamento, sem tratamento pelo consumidor, aumentando o risco de contaminação (Berbari et al., 2001).

2.3. Armazenamento e Conservação de Hortaliças Folhosas Minimamente Processadas

Verduras e hortaliças são pobres em proteínas, porém são compostas de fibra, amido, vitaminas, minerais e óleos. O seu pH varia entre 5 e 7 e sua atividade de água é $>0,97$ (Franco & Landgraf, 1996). Desta forma são favoráveis para o crescimento de microrganismos, se as condições extrínsecas (como, por exemplo, temperatura e umidade) forem também favoráveis (Reiji et al., 2004).

Os vegetais, depois de colhidos, continuam respirando, assim as técnicas de manuseio e armazenamento são voltadas para a diminuição da taxa de respiração, através do controle da temperatura, umidade relativa e gases atmosféricos, fazendo com que os vegetais permaneçam saudáveis por mais tempo (ICMSF, 1997; Chitarra, 1990).

A umidade relativa e a circulação de ar são fatores importantes e que devem ser controlados durante o armazenamento da matéria-prima. Muitos vegetais mantêm-se à umidade relativa entre 90-95%. Assim, um fluxo de ar adequado impede a deposição de umidade na superfície do vegetal, retardando o crescimento microbiano (Chitarra, 1990).

As principais técnicas de conservação dos produtos minimamente processados consistem no emprego de refrigeração, além do acondicionamento em atmosfera modificada, uma mistura gasosa específica e ideal ao produto, capaz de minimizar as alterações fisiológicas. Ambos diminuem a respiração dos vegetais, retardando o seu envelhecimento, mantendo a rigidez de seus tecidos e diminuindo a deterioração por microrganismos (Maistro, 2001). Atmosferas com 2-5% de O₂ (Francis et al., 1999) e CO₂ acima de 10% são recomendáveis para hortaliças, pois mantêm a qualidade deste produto (Sarantópoulos et al.; 2000). Porém, essas condições de embalagem e armazenamento não são inibitórias ao crescimento microbiano. Temperatura de armazenamento em torno de 0 °C retarda grandemente o crescimento da maior parte da microbiota que causa deterioração. Entretanto, são poucos os vegetais que podem ser armazenados a essa temperatura (Sarantópoulos et al.; 1996). Vale ressaltar que a estocagem sob refrigeração será seletiva para microrganismos psicotróficos que afetam não só o armazenamento, mas também aumentam o risco microbiológico de infecção por *Listeria monocytogenes* quando presente, uma vez que esta continua crescendo nas temperaturas recomendadas pelos fabricantes de produtos minimamente processados.

2.4. O Gênero *Listeria* e Listeriose

Os membros do gênero *Listeria* são microrganismos amplamente distribuídos no ambiente, definidos como bastonetes regulares Gram positivos, não formadores de esporos, catalase positivos e não-produtores de H₂S. Crescem numa ampla faixa de temperatura (3-45 °C), com temperatura ótima entre 30-37 °C, sendo considerados psicro-tolerantes, em função da capacidade de multiplicar-se em temperaturas de refrigeração (Silva et al., 2001). Possuem um aumento do seu crescimento sob concentração reduzida de oxigênio (Ryser, 1998). Apresentam motilidade característica a 20-25 °C, com movimentos rotatórios ou de tombamento, mas são imóveis a 37 °C. São anaeróbios facultativos, fermentando a glicose com produção de ácido lático, sem produção de gás (Silva et al., 2001).

O gênero *Listeria* encontra-se atualmente constituído por seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi*, cujas características encontram-se descritas na tabela 1 (Hitchins, 2003). A espécie *L. denitrificans* foi reclassificada como *Jonesia denitrificans* e as espécies *L. grayi* e *L. murrayi* foram agrupadas em uma única espécie, *L. grayi*. A espécie *L. ivanovii* foi subdividida em duas subespécies: *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* e *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* (Franco & Landgraf, 1996). Dentre as espécies, *L. monocytogenes* é patogênica para o homem. Porém, já foram relatados 3 casos em humanos causados por *L. ivanovii* e um por *L. seeligeri* (Jay, 2005).

Tabela 1. Características das espécies de *Listeria* (segundo Bille et al., 1999, com modificação).

Teste	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	<i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>
β-hemólise	+a	+	+	-	-	-	-
Camp-teste <i>S. aureus</i>	+	+	-	-	-	-	-
Camp-teste <i>R equii</i>	-	-	+	-	-	-	-
Motilidade guarda-chuva a 25 °C	+	+	+	+	+	+	+
Teste de VM	+	+	+	+	ND	+	+
Teste de VP	+	+	+	+	ND	+	+
Redução de nitrato	-	ND	-	-	ND	-	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento TSI	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
OF Glicose	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF
Fermentação							
Manitol	-	-	-	-	-	+	+
Xilose	-	+	+	-	+	-	-
Rhamnose	+	-	-	d	d	-	d

a = algumas poucas cepas são negativas

+ = 90% ou mais cepas são positivas em 48h

- = 90% ou mais cepas são negativas em 48h

d = 11- 89% das cepas são positivas

Reações em TSI Bisel/Fundo: A = ácido, K = alcalino

OF Glicose: O = Oxidativo, F = Fermentativo

ND = Não determinado

A listeriose, ao contrário da maioria das infecções de origem alimentar que geralmente provocam sintomas gastrintestinais, se manifesta inicialmente com sintomatologia semelhante a um resfriado, com febre baixa e mal-estar geral, podendo progredir para meningite, meningoencefalite, septicemia, aborto ou parto prematuro (Ryser, 1998). Os grupos susceptíveis à doença, considerados grupos de risco, são mulheres grávidas (e seus fetos), crianças, idosos e indivíduos com o sistema imunológico comprometido (Silva

et al., 2001). A preocupação quanto a listeriose deve-se à altas taxas de mortalidade: nos casos de meningite a mortalidade pode chegar a 70%; nos de septicemia, a mortalidade é de 50% e em infecções perinatais-neonatas é maior que 80% (Forsythe, 2002). O recém-nascido sobrevivente pode sofrer de septicemia ou meningite.

L. monocytogenes foi descrita pela primeira vez em 1911, sendo sua melhor descrição feita em 1923. O primeiro caso de listeriose humana foi relatado em 1929 e a partir daí, a doença vem ocorrendo esporadicamente pelo mundo. Em geral, essa bactéria tem sido encontrada em leites e derivados, carnes frescas ou congeladas e derivados, frutos do mar, frutas, vegetais e seus produtos (Jay, 2005; Franco & Landgraf, 1996; Farber & Peterkin, 1991). É plausível que de 1 a 10% da população sejam portadores intestinais de *L. monocytogenes* (Forsythe, 2002).

Diferentes critérios ou recomendações para os níveis de *L. monocytogenes* em prontos-para-consumo têm sido estabelecidos em diferentes países: nos Estados Unidos e na Itália é exigida a ausência do patógeno em 25 g do alimento (Forsythe, 2002); no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária também segue o mesmo padrão para queijos (ANVISA, 2001). Já na Alemanha, Países Baixos, França, Reino Unido e Grã-Bretanha é aceitável uma tolerância de 100 UFC/g (Jay, 2005; Mena et al., 2004). Apesar de Schlech (1996) concluir que não existem dados que justifiquem uma tolerância de 10^2 UFC/g, a Comissão Internacional em Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF) recomenda que, se esse microrganismo não exceder 100/g de alimento, este pode ser considerado

aceitável para indivíduos que não estão sob risco (Jay, 2005). Essa resolução é mais realista, pois em certos alimentos a ausência de *L. monocytogenes* é considerada impossível. Porém, essa tolerância dada a alimentos que suportem o crescimento do patógeno, como os refrigerados, pode tornar um risco o seu consumo, pois a bactéria pode atingir níveis mais elevados durante o armazenamento e antes do consumo. Para máxima segurança é desejável que a *L. monocytogenes* esteja ausente no alimento.

2.5. *Listeria* sp. em Hortaliças Folhosas Minimamente Processadas

Essa bactéria pode ser isolada de diversos ambientes, incluindo vegetação em decomposição, terra, ração animal, esgoto e água (Seeliger & Jones, 1986). Investigações epidemiológicas de surtos e casos esporádicos associaram à doença uma grande variedade de alimentos e fontes de contaminação. O primeiro grande surto causado por *Listeria monocytogenes* aconteceu no Canadá, em 1981, envolvendo 34 casos perinatais e sete adultos. O alimento envolvido na transmissão da doença foi salada de repolho. Esse alimento, encontrado na geladeira de um dos pacientes, continha a linhagem epidêmica de *L. monocytogenes*. O rastreamento dessa linhagem conduziu à fonte de contaminação: adubo de fezes de carneiro (Farber & Peterkin, 1991).

Os alimentos de mais alto risco são aqueles prontos para consumo, armazenados à temperatura de refrigeração por longo período, permitindo um desenvolvimento de *Listeria* em níveis significativamente elevados (Rocourt, 1996; Faber & Peterkin, 1991). Berrang et al. (1989) mostraram que cepas

inoculadas de *L. monocytogenes* poderiam proliferar em aspargos, brócolis e couve-flor embalados sob condições de atmosfera modificada e permanecer em temperatura de refrigeração. De igual forma, tem sido mostrado o crescimento de *L. monocytogenes* em alface (Farber et al., 1989). Essa bactéria já foi isolada de broto de feijão, repolho, pepino, alface, batata, rabanete, tomate, saladas prontas, berinjela e cogumelo (Buck et al., 2003).

Reij et al. (2004) e Curtis et al. (2002) colocam *Listeria* sp. entre os microrganismos indicadores de higiene e para verificação de fontes de contaminação em planta de processamento. Essa bactéria introduzida em qualquer etapa do processamento, com a falta de um agente antimicrobiano efetivo, pode permanecer na indústria e estar presente no produto final (Buck et al., 2003). Segundo pesquisa realizada por Brackett (1987), observou-se que o hipoclorito, na concentração de 200 ppm, é ineficaz na remoção de *L. monocytogenes* em vegetais contaminados. Zhang & Farber (1996) constataram que o cloro, na concentração de 200 ppm por 10 minutos, foi capaz de reduzir 1 log de *L. monocytogenes* na higienização de alface e repolho. Buck et al. (2003) relataram que o tratamento com 500 ppm de cloro livre não foi efetivo contra *L. monocytogenes* em biofilme formado com várias outras espécies.

Gleeson e O'Beirne (2005) avaliaram diversos materiais de corte de vegetais quanto aos danos causados aos tecidos durante o processamento mínimo e o desenvolvimento de *L. innocua*. Esta bactéria teve melhor crescimento nos vegetais cortados em máquinas. O material que causou menos danos foi a lâmina em corte manual e a picagem manual (rasgos). Os

danos causados pelos cortes também afetaram similarmente o crescimento de heterotróficos.

A sobrevivência de patógenos como *L. monocytogenes* na superfície de frutos e hortaliças é aumentada quando a temperatura de armazenamento é reduzida a 10 °C ou menos (Flessa et al., 2005). Beuchat e Brackett (1990) estudaram a sobrevivência e crescimento de *L. monocytogenes* em alface minimamente processada armazenada a 5 °C e 10 °C. Não foram observadas mudanças significativas durante 8 dias de armazenamento a 5 °C. Entretanto, houve um crescimento significativo entre 8 e 15 dias. Também houve um crescimento significativo durante 3 dias de armazenamento a 10 °C, e após 10 dias, a população atingiu a taxa de 10^8 - 10^9 UFC/g. Eles concluíram que *L. monocytogenes* é capaz de crescer em alface sujeita ao tratamento normalmente dado aos vegetais e saladas minimamente processados industrializados. Thomas et al. (1999) analisando o crescimento de *L. innocua* e *L. monocytogenes* em vegetais armazenados em diferentes temperaturas, encontraram que a temperatura de 3 °C é listeriosstática para uma população de 10^4 UFC/g durante 10 dias de armazenamento.

Segundo Ng e Seah (1995), a presença de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo é de particular preocupação. Ele pode causar risco à saúde pública em geral ou aos indivíduos do grupo de risco, que deveriam evitar saladas preparadas previamente.

2.6. Métodos Moleculares para Tipificação

A caracterização de microrganismos utilizando testes bioquímicos depende da expressão fenotípica dos mesmos e, geralmente não distinguem

isolados da mesma espécie. Todavia, para obter-se informações como fonte de contaminação há a necessidade de métodos que permitam uma discriminação entre isolados de mesma espécie (Pimenta et al., 1999). A diferenciação entre isolados é importante tanto no estudo de surtos e epidemias, quanto no estudo da ecologia molecular de alimentos e plantas de processamento.

Os métodos mais utilizados para diferenciação entre isolados de *L. monocytogenes* são: sorotipificação e tipificação molecular, como eletroforese em campo pulsado (PFGE), polimorfismo do fragmento de restrição (RFLP) e ribotipificação. Atualmente, por serem mais discriminativos e gerarem mais padrões, os métodos moleculares têm sido amplamente utilizados (Gendel, 2004).

Diversos procedimentos moleculares têm sido desenvolvidos e aplicados para a tipificação de *L. monocytogenes* (Mereghetti et al., 2002; Byun et al., 2001). Sua tipificação é importante tanto para investigação de surtos alimentares, quanto para análise de fonte e rotas de contaminação na planta de processamento (Martinez et al., 2003). O Centro de Prevenção e Controle de Doença dos Estados Unidos tem utilizado PFGE para investigação de surtos causados por *L. monocytogenes* (Graves et al., 2005). Analisando a similaridade genética de *L. monocytogenes* através da ribotipificação, Jaradat et al. (2002), encontraram isolados similares em diferentes regiões geográficas e entre isolados de pacientes e alimentos, podendo ser derivados de clones relacionados. Norton et al. (2001), através da ribotipificação, estudou a ecologia de *L. monocytogenes* isoladas da matéria-prima e do ambiente de processamento de uma indústria de alimentos, para identificar a origem de

contaminação. Quinze diferentes ribotipos foram identificados entre os 85 isolados testados. Este trabalho demonstrou que a matéria prima e o ambiente de processamento foram as fontes de contaminação do produto final.

O polimorfismo do fragmento amplificado ao acaso (RAPD) emprega o uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para obter perfis de polimorfismos do DNA. Martinez et al. (2003) utilizaram RAPD para analisar a variabilidade genética em 432 *L. monocytogenes*, a maioria coletada na Noruega, isoladas de plantas de processamento, alimentos e pacientes hospitalizados. Os resultados obtidos não relacionaram linhagens específicas a nenhum tipo de alimento ou planta de processamento, e os casos de listeriose mostraram-se esporádicos, não sendo relacionados a nenhuma fonte específica de alimento. Kerouanton et al. (1998) utilizaram quatro marcadores moleculares (PFGE, RAPD, ribotipificação através do RFLP, e Zimotipificação) para caracterização de *L. monocytogenes*. PFGE foi o que teve maior índice discriminatório (12 padrões) sendo este aumentado quando combinado com a ribotipificação (gerando 27 padrões nos 35 isolados).

Métodos moleculares são também usados na detecção direta de microrganismos na amostra. A PCR tem sido amplamente utilizada na detecção direta de patógenos nos alimentos. Oligonucleotídeos iniciadores que amplificam o gene da hemolisina (*hly*) em *L. monocytogenes* tem sido usado para esse fim, com outros oligonucleotídeos (multiplex PCR) ou sem para detecção simultânea de outros patógenos (Wang et al., 1997). Outro gene utilizado na detecção de *L. monocytogenes* é o gene *prfA*, que regula positivamente a expressão de vários fatores de virulência (Jofré et al., 2005).

Ha et al. (2002) utilizaram Nested PCR do gene *iap* para identificação e detecção de *L. monocytogenes* em leite cru na Coréia, demonstrando ser um método útil para uma rápida detecção e confirmação de *L. monocytogenes*.

A biologia molecular também pode auxiliar na identificação de *Listeria*, uma vez que o teste de hemólise, bastante realizado em laboratório, é o único que diferencia as espécies *L. innocua* (não hemolítica) e *L. monocytogenes* (fracamente hemolítica). Strom (1998), usando a técnica da PCR para confirmação dos isolados previamente identificados, observou que um isolado, identificado como *L. innocua*, foi confirmado, através da amplificação dos genes *iap* e *hly* como *L. monocytogenes*. Através do sequenciamento foi verificado que o gene *hly* tinha uma deleção e assim não expressava hemólise.

2.7. Região Intergênica 16S – 23S do rDNA

Dentre os métodos moleculares mais utilizados para caracterização genética encontra-se o da amplificação das regiões conservadas 16S e 23S do DNA ribossomal. Esses genes constituem operons, que podem estar presentes nos microrganismos numa quantidade de 1 a 11 (Figura 1). A amplificação desses fragmentos é útil para avaliar a diversidade microbiana ambiental. Porém, amplificando-se a região intergênica, uma região não tanto conservada mas utilizando oligonucleotídeos iniciadores que estejam presentes nas bordas de seqüências altamente conservadas (16S, 23S e 5S), pode-se obter maiores informações sobre a diversidade dos microrganismos analisados (García-Martinez et al., 1999; Nagpal et al., 1998; Cilia et al., 1996; Jensen et al., 1993). Essa amplificação da região fornece um marcador molecular de tamanho

variável, que permite observar padrões de número de bandas diferentes entre espécies do mesmo gênero. No caso de *Listeria*, é possível verificar, analisando as seqüências no GenBank, que o tamanho da região intergênica 16S – 23S do rDNA apresenta variação: *L. monocytogenes*: 242 pb, 265 pb, 275 pb; *L. innocua*: 245 pb, 494 pb; *L. seeligeri*: 245 pb; *L. ivanovii*: 245 pb, 491 pb; *L. welshimeri*: 244 pb; *L. grayi* subsp. *grayi*: 233 pb, 458 pb.

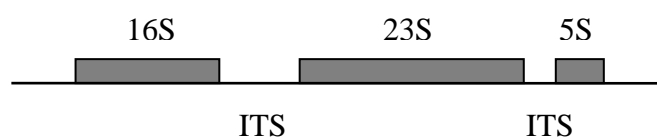


Figura 1: Arranjo dos genes 16S, 23S e 5S do operon e suas regiões espaçadoras (ITS).

A caracterização de diferentes espécies bacterianas através da amplificação da região intergênica do rDNA 16S – 23S, sendo ou não clivada com enzimas de restrição, tem sido bastante utilizada por pesquisadores para análise de diferentes gêneros bacterianos, identificação de algumas espécies, análise da variabilidade da região intergênica, diferenciação entre espécies do mesmo gênero, relações inter e intra-específicas de linhagens e análise de relações filogenéticas entre espécies (Clementino et al., 2001; Toth et al., 2001). Luz et al. (1998) utilizaram este método para analisar a variabilidade da região intergênica em sub-espécies de *Salmonella enterica*. Antón et al. (1998) avaliaram a diversidade do espaço da região intergênica dos operons de rRNA em isolados de *Escherichia coli*. Para fazer diferenciação entre isolados de

Mycobacterium tuberculosis, Abed et al. (1995) utilizaram os métodos de amplificação da região intergênica 16S – 23S rDNA e RAPD. Porém, um índice discriminatório maior foi obtido através do RAPD aplicado aos fragmentos amplificados da região 16S – 23S do rDNA. Além de ser o resultado mais fácil de se analisar, esse método teve alto poder discriminatório pelo alto grau de polimorfismo da região 16S – 23S do rDNA.

Jensen et al. (1993) utilizaram o polimorfismo da região 16S – 23S rDNA amplificada para identificação tanto de gênero como de espécie de 28 bactérias diferentes (300 isolados), dentre elas, foi estudada *Listeria*. Apesar do polimorfismo da região intergênica já ter sido utilizado com sucesso para caracterizar isolados de *Listeria* (Somer et al., 2005; Graham et al., 1997; Jensen et al., 1993), essa região ainda é pouco estudada no gênero.

A aplicação dos métodos moleculares pode fornecer informações sobre diferentes linhagens de *Listeria*. Essas informações podem ser usadas no desenvolvimento de práticas para melhoramento do controle desse importante patógeno na indústria de alimentos (Norton et al., 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram executados no Laboratório de Microbiologia Ambiental Molecular do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.1. Amostras

As amostras foram constituídas por saladas de hortaliças folhosas minimamente processadas, prontas para consumo, de marcas diferentes, apresentando composição distinta (Tabela 2), embaladas em pacotes com atmosfera modificada e conservadas sob refrigeração, comercializadas em supermercados da cidade de Porto Alegre, RS.

3.2. Coleta e Transporte das Amostras

Foram coletadas, aleatoriamente em supermercados de Porto Alegre, 4 amostras por mês no período de Agosto de 2004 a Agosto de 2005, totalizando 52 amostras. Em cada local, foi anotada a temperatura do balcão de refrigeração. As amostras foram acondicionadas em bolsas térmicas e transportadas, em sua embalagem original, ao Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia da UFRGS.

Tabela 2: Origem, marca, tipo de salada e composição das amostras analisadas.

ORIGEM	MARCA	SALADA	COMPOSIÇÃO
POA/ RS*	A	A1	Fios de cenoura, rúcula, alface americana e crespa
		A2	Fios de cenoura, alface americana e crespa, tempero verde, cebolinha, tomate cereja e croutons.
		A3	Alface americana, radite e cenoura palito
	B	B1	Alface americana e crespa roxa, couve chinesa e cenoura
		B2	Alface americana, repolho roxo e cenoura
		B3	Alface americana e chicória roxa
SJP/ PR**	C	C1	Alface americana, escarola frisée e radite
		C2	Alface americana, repolho roxo e cenoura
		C3	Alface americana, rúcula e radite

* Porto Alegre – RS

** São José dos Pinhais – PR

3.3. Análises Microbiológicas

3.3.1. Preparação das Amostras

Para compor uma amostra, três unidades de amostra (pacotes) do mesmo tipo de salada, da mesma marca e mesmo lote, foram homogeneizadas em frascos estéreis e, a partir dessa mistura (600 g), foi retirada a unidade analítica (25 g) para a análise (ANVISA, 2001).

3.3.2. Enriquecimento Seletivo, Semeadura em Meio Sólido Seletivo Diferencial e Isolamento

Depois de pesados, 25 g da amostra foram transferidos para 225 mL de Caldo de Enriquecimento para *Listeria* (LEB) (Difco) (Hitchins, 2003). A cultura foi homogeneizada e incubada a 30 °C por 7 dias, sendo retirada uma alçada para semeadura em meio sólido seletivo Ágar Oxford Modificado (MOX) (Difco) e Ágar Palcam (PAL) (Merck) no tempo de incubação 48 horas e 7 dias

(Farber et al., 1994). As placas de meio sólido foram incubadas a 35 °C por 24 a 48 horas. Observou-se o aparecimento de colônias características: esféricas, 1-3 mm de diâmetro, pretas, rodeadas por um halo preto de hidrólise da esculina.

3.3.3. Purificação

As colônias características de *Listeria* isoladas de MOX e PAL foram transferidas, por esgotamento, para Ágar Triptona de Soja (Himedia) suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE) e incubadas a 30 °C por 24 a 48 horas. As placas foram examinadas sob luz oblíqua e selecionada uma colônia azulada típica, bem isolada. A colônia foi transferida para TSA-YE inclinado e Caldo Triptona de Soja (Himedia) suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE). Os meios foram incubados a 30 °C por 24 horas. As culturas em TSA-YE e TSB-YE foram utilizadas para a realização das provas bioquímicas.

3.3.4. Confirmação das Colônias Características de *Listeria* sp. e Identificação em Gênero e Espécie

Colônias típicas de *Listeria* spp. foram confirmadas pelos testes de coloração de Gram, catalase, crescimento em Ágar Tríplice Açúcar Ferro, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e motilidade; e identificadas pelos testes de β -hemólise, CAMP, fermentação de açúcares e redução de nitrato (Hitchins, 2003; Farber et al., 1994). Foram utilizadas como controle positivo dos testes *L. monocytogenes* ATCC 15315 e *L. innocua* ATCC 33090. Os isolados de *Listeria* spp. identificados foram semeados em Ágar Conservação (8.1.1), incubados a 35 °C por 48 horas e armazenados em temperatura ambiente.

3.3.4.1. Identificação do Gênero

a) Coloração de Gram

Foi feita coloração de Gram dos isolados observando-se características típicas de *Listeria* spp.: pequeno bacilo Gram-positivo, com ou sem arranjo em pares ou em forma de V.

b) Catalase

Em placas de TSA-YE, após incubação a 30 °C por 24 horas, uma colônia típica foi coberta com peróxido de hidrogênio a 3% e observada a ocorrência de borbulhamento (teste positivo) ou não-borbulhamento (teste-negativo). *Listeria* spp. são catalase positivas.

c) Crescimento em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI)

A partir da cultura em TSB-YE, os isolados foram inoculados em ágar TSI (Biobrás) inclinado, por picada e estria, e incubados a 35 °C por 5 dias, fazendo-se a leitura diariamente. *Listeria* spp. produz ácido no bisel e na base, sem produção de H₂S.

d) Teste de Vermelho de Metila (VM) e Voges-Proskauer (VP)

A partir da cultura em TSB-YE, foi inoculada uma alçada em caldo VMVP (8.1.2), e incubada a 35 °C por 48 horas. Após incubação, foi removido 1 mL e realizado teste de VP adicionando-se solução de α -naftol (5%) e solução de KOH (40%). O aparecimento de um halo de cor vermelha é indicativo de resultado positivo. A cultura remanescente foi incubada por mais 48 horas para teste de VM. Após este período, foram adicionadas gotas de vermelho de metila ao tubo. A alteração da cor do meio para vermelho é indicativa de resultado positivo. *Listeria* spp. são VM e VP positivas.

e) Teste de Motilidade com Cloreto de Trifeniltetrazólio (MacFaddin, 2000)

A partir da cultura em meio TSB-YE, foi feita inoculação por picada em Ágar SIM (Biobrás), adicionado de 5 mL/L da solução de 1% de Cloreto de Trifeniltetrazólio. Foi feita incubação à temperatura de 25 °C por 7 dias, sendo verificada diariamente, visando observar o crescimento típico. *Listeria* spp. são móveis e desenvolvem uma zona de migração típica, espalhando-se na parte superior do meio e mantendo-se restritas à picada no fundo do tubo. Esse tipo de migração produz uma massa de crescimento característica, lembrando um guarda-chuva. Na presença do corante Cloreto de Trifeniltetrazólio, essa migração é observada através da coloração vermelha (Figura 2).

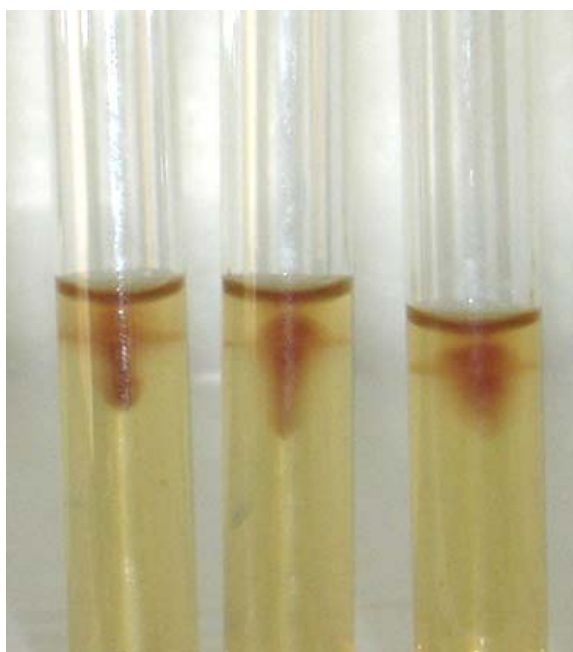


Figura 2: Motilidade característica de *Listeria* spp. no meio SIM com 0,005% de Cloreto de Trifeniltetrazólio.

3.3.4.2. Identificação das Espécies

a) Teste de β -hemólise

A partir dos tubos de TSA-YE, os isolados foram semeados em placa de Ágar TSA suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro (Laborclin), e esta incubada a 35 °C por 24 a 48 horas. Foi observada a presença ou não do halo de β -hemólise. *L. monocytogenes* e *L. seeligeri* formam halo discreto, enquanto *L. ivanovii* forma halo grande e bem definido e *L. innocua* não apresenta hemólise.

b) Fermentação de açúcares

Os isolados, a partir dos tubos de TSB-YE, foram transferidos para tubos de Caldo Púrpura Base (8.1.3) suplementado com 0,5% do carboidrato (ramnose, xilose e manitol) e incubados a 35 °C por 7 dias. Os tubos foram examinados diariamente, verificando-se a utilização do açúcar pela cultura.

c) CAMP-teste

Foram inoculadas uma cultura β -hemolítica de *S. aureus* e uma cultura de *Rhodococcus equii* em placa de Ágar TSA suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Os isolados de *Listeria* spp. foram semeados perpendicularmente à semeadura de *S. aureus* β -hemolítico e *R. equii*. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 a 48 horas, sendo observada a ocorrência de halo transparente de hemólise em redor das estrias inoculadas. As cepas de *L. monocytogenes* produzem uma reação de hemólise discreta, porém, nas proximidades da estria de *S. aureus*, o halo torna-se maior e mais nítido. As cepas de *L. ivanovii*, ao contrário, apresentam halo mais nítido nas

proximidades da estria de *R. equii*. *L. seeligeri* apresenta reação semelhante à de *L. monocytogenes*.

d) Redução de Nitrato

A partir dos tubos de TSB-YE, as culturas foram semeadas em Caldo Nitrato (8.1.4) e incubadas a 35 °C por 5 dias. Após a incubação, foram adicionados aos tubos as soluções ácido sulfanílico 0,8% e α -naftol 0,5%. Foi observado o desenvolvimento de uma cor avermelhada (positivo) ou inalteração do meio (negativo). Nos tubos com resultado negativo, foi acrescentado pó de zinco para certificação da não redução do nitrato. Dos tubos que permaneceram inalterados confirmou-se resultado positivo e dos que mudaram para cor vermelha confirmou-se resultado negativo.

Os isolados não identificados pelos testes bioquímicos, foram submetidos ao sistema de identificação api® Listeria (Bio Merieux), que consiste nos testes: presença de arilamidase (DIM teste), hidrólise de esculina, presença de α -manosidase, utilização dos carboidratos, D-arabitol, D-xilose, L-ramnose, α -metil-D-glucosídeo, D-ribose, glicose-1-fosfato e D-tagatose.

3.4. Análises Moleculares

3.4.1. Extração do DNA Cromossomal dos Isolados de *Listeria* spp.

A cultura armazenada em Ágar Conservação foi semeada em 5mL de Caldo TSB e incubada a 37 °C por 18 a 24 horas sob agitação. Dessa cultura, foram retirados 3 mL para um microtubo e centrifugados, por 1 minuto a 10000 g, para obtenção de precipitado de células. O sobrenadante foi

descartado e o precipitado lavado com NaCl 1 M, centrifugado novamente e o sobrenadante descartado.

A extração do DNA cromossomal foi realizada conforme Ausubel et al. (1991) com modificações. O precipitado de células foi ressuscitado em TE (10 mM Tris, 25 mM EDTA, pH 8,0) seguido de adição de SDS (concentração final de 0,6%), Lisozima (concentração final de 0,2 mg/mL) e RNase (concentração final de 0,2 mg/mL). Foi feita homogeneização seguida de incubação a 37 °C por uma hora. Após esse período, foi adicionada proteinase K (concentração final de 0,6 mg/mL), e incubado a 56 °C por 15 minutos. Após incubação, foi adicionado mesmo volume de fenol tamponado e feita a extração de fenol, a qual foi repetida até que a interface estivesse sem resíduos (homogeneização e centrifugação a 10000 g por 10 minutos). O sobrenadante foi retirado para um novo microtubo e acrescentado igual volume de fenol / clorofórmio / álcool isoamílico (25:24:1 v/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo, adicionado igual volume de clorofórmio / álcool isoamílico (24:1 v/v), feita homogeneização e centrifugação de mesma forma. Por fim, foram acrescentados 0,7 volumes de isopropanol ao sobrenadante, homogeneizado e centrifugado a 10000 g por 20 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol 70% e seco em temperatura ambiente. Depois de seco, o precipitado foi ressuscitado em TE (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e incubado a 65 °C por 15 minutos.

Foram retirados 2 µL do DNA extraído para quantificação, comparando-os com 1 µL de concentrações conhecidas (5 ng, 10 ng, 62,5 ng,

125 ng, 250 ng e 500 ng) de DNA do fago λ , observadas através da fluorescência em gel de agarose com brometo de etídeo (concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O DNA extraído foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise.

3.4.2. Amplificação do Fragmento 16S – 23S do rDNA

Foi feita amplificação da região intergênica 16S – 23S rDNA, utilizando oligonucleotídeos iniciadores para *Listeria* spp. Estes oligonucleotídeos foram desenhados com base nas seqüências do 16S rDNA e 23S rDNA para as diferentes espécies de *Listeria*, encontrados no GenBank.

A seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram:

5' GCT GGA TCA CCT CCT TTC TA 3' 16S LisF

5' GCG CCC TTY CTA ACY TAA CC 3' 23S LisR

As reações foram realizadas contendo 2 mM MgCl_2 (Invitrogen), 0,2 mM de dNTPs, 0,38 μM do oligonucleotídeo 16S LisF, 0,5 μM do oligonucleotídeo 23S LisR, 1 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1x de tampão de reação da *Taq* polimerase (Invitrogen), água MilliQ estéril e 100 ng do DNA bacteriano extraído, em um volume final de 25 μL .

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Mastercycler Personal Eppendorf) nas seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de: desnaturação a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, anelamento a $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto e extensão a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, terminando com um ciclo final de extensão a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos.

Os controles positivos e negativos foram feitos em cada bateria de PCR. O controle positivo das reações foi feito com *L. monocytogenes* ATCC 15315 e *L. innocua* ATCC 33090. O controle negativo foi feito acrescentando-

se água Milli Q estéril ao invés de DNA. O comportamento das linhagens de referência foi o mesmo em todas as reações.

3.4.3. Análise dos Fragmentos Amplificados

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (Sambrook et al., 1989) sob uma corrente de 10 V/cm por 2 horas e 30 minutos. Após corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), analisado sob luz ultravioleta e fotografado em câmera digital Kodak 1D (versão 3.5.2). Foi utilizado o marcador λ *Eco* RI / *Hind* III / *Cla* I como padrão para os tamanhos dos fragmentos. A análise dos tamanhos dos fragmentos amplificados foi realizada através do cálculo de regressão de potência, com um coeficiente de correlação $r > -0,98$.

3.4.4. Análise Estatística

A similaridade entre as amostras foi calculada por coeficiente de Jacard e a análise de agrupamentos realizada através de UPGMA (“Unweight pair group method using average”), utilizando-se o programa NTSYS (versão 1.4).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Presença de *Listeria* sp. em amostras de hortaliças folhosas minimamente processadas

Listeria sp. foi isolada em 23 das 52 amostras de hortaliças folhosas minimamente processadas, sendo encontradas: *L. seeligeri* em 11, *L. monocytogenes* em 7, *L. welshimeri* em 7, *L. grayi* em 6, *L. innocua* em 4 e *L. ivanovii* em 3 amostras. Doze amostras apresentaram 2 ou mais espécies de *Listeria* (Tabela 3). Em relação a *L. monocytogenes*, resultado semelhante foi obtido por Pinto et al. (2001) em Portugal: 12 das 108 amostras de vegetais estavam contaminadas com *L. monocytogenes*. Uma ocorrência maior de *L. monocytogenes* foi encontrada em vegetais orgânicos minimamente processados em Zâmbia: 3 positivas das 20 amostras de saladas de vegetais e 13 das 60 de feijão verde analisadas (Nguz et al., 2005).

Listeria sp. é comumente encontrada em diversos produtos vegetais frescos, como tem sido demonstrado em alguns trabalhos. Thunberg et al. (2002) observaram que 10 de 47 vegetais adquiridos em armazéns (Washington, D.C, Estados Unidos) apresentaram *Listeria* sp. Dentre os produtos analisados, os contaminados com *Listeria* sp. foram: aipo, agrião, alface, broto de feijão, batata, broto de soja e batata doce, sendo

Tabela 3: Distribuição das espécies de *Listeria* sp. isoladas por coleta, marca e tipo de salada.

MÊS DE COLETA	MARCA	TIPO SALADA (AMOSTRA)	Nº DE ISOLADOS							
			<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	<i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	<i>Listeria</i> sp.
Agosto/2004	A	A1	-	-	3	1	-	-	-	-
		A2	3	-	-	-	-	1	-	-
Outubro/2004	B	B1	-	-	1	1	-	18	-	-
Novembro/2004	B	B2	-	-	13	-	-	1	-	-
Dezembro/2004	A	A1	-	-	-	2	-	1	-	-
		A3	-	3	1	3	-	4	1	-
Janeiro/2005	A	A1	1	-	-	-	-	-	-	-
		A2	-	1	-	-	-	-	-	-
Fevereiro/2005	A	A1	-	1	-	-	-	-	-	-
		A2	4	2	-	-	-	-	-	-
Março/2005	B	B1	-	-	-	-	1	-	-	-
		A2	-	-	2	-	1	-	-	-
Abril/2005	A	B1	1	-	-	-	-	-	-	-
		B3	-	-	-	1	-	-	-	-
Maio/2005	A	A2	3	-	-	-	-	-	-	-
		A3	2	-	19	-	-	-	-	-
Junho/2005	A	C1	6	-	-	-	-	-	-	-
		A1	-	-	1	-	-	-	-	-
Julho/2005	A	A3	-	-	38	1	-	-	-	-
		A1	-	-	5	1	-	-	-	1
Agosto/2005	A	A3	-	-	6	-	-	-	-	-
		A2	-	-	-	-	18	-	-	-
Total:		23	7	4	11	7	3	6	1	1

L. monocytogenes encontrada em 6 amostras, *L. innocua* em 8, *L. welshimeri* em 8 e *L. grayi* em 3. Yan et al. (1996) analisaram 25 amostras de saladas minimamente processadas prontas para consumo no Canadá, e encontraram que 14 continham *L. monocytogenes*. Mena et al. (2004), em Portugal, analisaram 271 amostras de vegetais congelados, das quais 35 estavam contaminadas com *L. monocytogenes*: 18 de abobrinha, 6 de brócolis, 4 de ervilha e 7 de pimentão verde. Ainda em Portugal, Lisboa, apenas uma das 23 amostras de vegetais prontos para consumo estava contaminada com *L. innocua*, mas nenhuma das 14 amostras de vegetais para sopa continham *Listeria* sp. (Guerra et al., 2001). Curtis et al. (2002), na Venezuela, avaliaram a presença de *Listeria* sp. em 120 amostras de vegetais minimamente processados. *Listeria* sp. foi encontrada em 25% das amostras e *L. monocytogenes* em 9%.

A presença de *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* em vegetais é bem variada, principalmente quando se trata de vegetais prontos para consumo. Estes podem ser veículos para o desenvolvimento de listeriose, uma vez contaminados com o patógeno. Na Irlanda do Norte, Harvey e Gilmour (1993) detectaram *L. monocytogenes* em 7 das 66 amostras de saladas prontas para consumo. Já no Japão, Kaneko et al. (1999a), verificaram ausência de *L. monocytogenes* em 27 amostras de saladas minimamente processadas, mas 2 delas continham *L. welshimeri* e *L. grayi* subsp. *murrayi*. Das 71 amostras de saladas cozidas prontas para consumo, 2 estavam contaminadas com *L. innocua* e 2 com *L. welshimeri*.

Não foi observada correlação entre a presença de *Listeria* sp. e a composição das saladas. *Listeria* sp. foi isolada de 16 amostras da marca A (n=24), 5 da marca B (n=10) e 2 da marca C (n=18). *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. grayi* foram isoladas das 3 marcas, *L. ivanovii* e *L. welshimeri* foram encontradas nas marcas A e B e *L. innocua* foi encontrada apenas na marca A (Tabela 4). Houve reincidência da mesma espécie na mesma marca em períodos diferentes do ano (Tabela 3).

Ng e Seah (1995), observaram que entre as 50 amostras de saladas de vegetais prontas para consumo analisadas, duas do mesmo fabricante, feitas de pepino, cenoura, batata, couve e molho de salada, encontravam-se contaminadas por *L. monocytogenes*. Isso faz pressupor que ela sobreviva em alimentos e ambiente de processamento por longos períodos de tempo (Jay, 2005).

Farber e Peterkin (1991) mostraram que *L. monocytogenes* pode ser encontrada tanto em ingredientes de saladas (2 das 108 amostras) quanto, em proporção ainda maior, em saladas minimamente processadas (8 das 42 amostras). Isso pode indicar que boa parte da contaminação por esse microrganismo deve-se à manipulação ou à contaminação cruzada durante o corte, a mistura e o empacotamento (Farber & Peterkin, 1991; Beuchat, 1996). Porém, resultado contrário foi encontrado por Johannessen et al. (2002) na Noruega: *L. monocytogenes* foi isolada em uma das 200 amostras de alface, uma das 156 amostras de cogumelos, mas não foi encontrada nas 100 amostras de saladas minimamente processadas.

Tabela 4: Distribuição das espécies de *Listeria* sp. e *Jonesia* isoladas por marca de salada.

ESPÉCIES	MARCA			TOTAL
	A	B	C	
<i>L. seeligeri</i>	75	14	1	90
<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	6	19	1	26
<i>L. monocytogenes</i>	13	1	6	20
<i>L. ivanovii</i>	19	1	–	20
<i>L. welshimeri</i>	8	2	–	10
<i>L. innocua</i>	7	–	–	7
<i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	1	–	–	1
<i>Listeria</i> sp.*	1	–	–	1
<i>J. denitrificans</i>	3	1	–	4
TOTAL	133	38	8	179

* Espécie não identificada.

Listeria sp. é considerada amplamente presente no ambiente e na natureza, estando associada à vegetação em decomposição (De Roever, 1998), solos, fezes de animais, silagem, esgotos e água (Jay, 2005). Essa onipresença pode ser verificada nesse trabalho. Todas as seis espécies de *Listeria* e *J. denitrificans*, foram encontradas nas amostras analisadas. *Listeria* sp. foi isolada em quase todo o período de coleta, exceto no mês de setembro de 2004. Tudo isso pode retratar a ampla distribuição desse microrganismo, principalmente nesse tipo de matéria-prima e ambiente (vegetal e solo), e sua resistência durante o processamento e armazenamento.

No presente trabalho, as espécies de maior distribuição ao longo do ano foram *L. seeligeri* e *L. welshimeri*, encontradas em todas as estações e em quase todas as marcas analisadas, sendo *L. seeligeri* a espécie predominante nas amostras. *L. grayi* foi encontrada no inverno, primavera e verão, *L. ivanovii*, no verão e inverno e *L. innocua*, somente no verão. *L. monocytogenes* foi encontrada no inverno, verão e outono, sendo uma amostra no inverno, 3 no verão e 3 no outono, prevalecendo nos meses mais quentes. Os meses de maior incidência foram de Janeiro a Abril de 2005, meses quentes, quando foram isoladas *Listeria* sp. em 3 amostras por coleta. O mês de dezembro foi o que apresentou maior variedade de *Listeria*, sendo isoladas 4 espécies (Tabela 3).

Também pode ser observado no presente estudo, que dentre as seis espécies de *Listeria* encontradas, apenas *L. grayi* não foi encontrada como única espécie em determinada amostra. *L. grayi* sempre foi isolada junto com as espécies *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. innocua* (Tabela 3).

Como já afirmado, a presença de *L. monocytogenes* em hortaliças prontas para consumo é preocupante, pois estes produtos são consumidos sem nenhum tratamento pelo consumidor causando risco à saúde pública em geral, principalmente aos indivíduos do grupo de risco, os quais deveriam evitar saladas prontas para consumo.

4.2. Isolamento e distribuição de *Listeria* sp. nos meios seletivos Ágar Oxford Modificado (MOX) e Ágar Palcam (PAL)

No presente trabalho, com o intuito de avaliar todas as *Listeria* presentes, todas as colônias características para o gênero *Listeria* isoladas nos meios seletivos Ágar Oxford Modificado (MOX) e Ágar Palcam (PAL) foram analisadas. Um total de 577 colônias características foi isolado de todas as coletas para a identificação. Dessas, apenas 175 colônias confirmaram ser *Listeria*, representando em torno de 30% das colônias analisadas. Isso corresponde a 1,5 colônia positiva de cada 5 colônias analisadas. O presente estudo reforça o questionamento feito por Pinto et al. (2001) e Johansson (1998), quanto à dificuldade de se isolar *Listeria* retirando-se apenas 5 colônias por placa nesse tipo de amostra. O grande número de colônias que não se confirmaram *Listeria* pode ser devido à diversidade de microrganismos acompanhantes em amostras de vegetais, diferentemente de produtos lácteos e cárneos.

Foi observada diferença entre os meios MOX e PAL quanto à quantidade de isolados confirmados de *Listeria* sp. e *L. monocytogenes*. Dentre as 292 colônias isoladas de MOX e 285 isoladas de PAL, apenas 52 e 123 colônias foram confirmadas *Listeria*, respectivamente. Porém, das 20 *L. monocytogenes* encontradas, 15 foram isoladas do ágar MOX e apenas 5 foram isoladas do ágar PAL. Este resultado vai ao encontro do método utilizado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2005), que indica o MOX, o qual mostrou ser mais eficiente no isolamento de *L.*

monocytogenes, apesar do PAL ser mais eficiente para isolamento de *Listeria* sp.

4.3. Identificação pelo api® *Listeria*

Das 175 *Listeria* isoladas, apenas 105 (60%) foram identificadas pelos testes bioquímicos tradicionais. Os outros 70 isolados apresentaram características do gênero pelos testes bioquímicos tradicionais, porém o teste de utilização de açúcares, um dos principais para identificação de espécie de *Listeria*, não confirmou nenhuma espécie. Imaginou-se, então, se havia a possibilidade de serem novas espécies de *Listeria* sp. Porém, o Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Seeliger & Jones, 1986) informa que a utilização de alguns açúcares pode ser variável em isolados de mesma espécie. O api® *Listeria* foi utilizado com sucesso na identificação desses isolados, em conjunto com o teste CAMP.

O conhecimento de bactérias do gênero *Listeria* sp. que não se adequam a nenhuma característica conhecida de suas espécies é importante, uma vez que trabalhos têm encontrado esse tipo de resultado. Pianta et al. (2004), analisando amostras de queijo colonial produzido e comercializado no Rio Grande do Sul, isolaram 36 *Listeria* sp., das quais apenas 6 puderam ser classificadas em espécies. As outras 30 apresentaram resultados contraditórios nos testes de hemólise, CAMP e utilização de açúcares. Thunberg et al. (2002) isolaram *Listeria* sp. não-identificada em 4 amostras de vegetais em Washington, D. C., Estados Unidos. Esse tipo de resultado não é incomum e muitas vezes os isolados não-identificados podem ser descartados.

A verificação das espécies de *Listeria* que não são identificadas pelos testes bioquímicos tradicionais é importante, pois pode haver entre elas a *L. monocytogenes*, sendo disseminada sem nenhum conhecimento. No presente trabalho, das 20 *L. monocytogenes* encontradas, 15 foram identificadas somente pelo api® *Listeria* com teste CAMP.

4.4. Caracterização Molecular

Foram caracterizadas molecularmente 164 das 179 espécies isoladas. Quinze bactérias: 6 *L. welshimeri*, 3 *L. innocua*, 2 *L. ivanovii*, 2 *L. seeligeri*, 1 *L. monocytogenes* e 1 *L. grayi* subsp. *grayi*, não foram recuperadas para a extração de DNA. Os isolados de *Jonesia* foram analisados por serem bactérias muito próximas à *Listeria*. Todos os isolados amplificaram, mostrando ser este método aplicável aos gêneros *Listeria* e *Jonesia*.

4.4.1. Análise dos fragmentos amplificados da região intergênica 16S – 23S do rDNA

A amplificação da região intergênica 16S – 23S do rDNA de *Listeria* gerou 44 padrões com 15 fragmentos distribuídos nos 164 isolados (Tabela 5). A figura 3 mostra alguns padrões encontrados no presente trabalho.

O padrão mais freqüente foi o 42, de um só fragmento de 366 pb, com 33 isolados, seguido dos padrões 24 e 29, ambos com 17 isolados, do padrão 19 (n=14), do padrão 40 (n=9) e do padrão 30 (n=8). Vinte e três padrões foram únicos (com apenas um isolado) e 15 padrões foram raros (com 2 a 5 isolados) (Tabela 5).

Quatorze padrões foram encontrados em mais de uma espécie e sete padrões foram inerentes a uma espécie. O padrão 28 foi inerente à

Tabela 5: Padrões encontrados na amplificação da região intergênica 16S-23S do rDNA dos 164 isolados de *Listeria* sp. e *Jonesia*.

Padrão	Fragmentos (pb)	Nº Isolados
1	198, 215, 242, 264, 284, 356	3
2	215, 242, 264, 284, 366	1
3	215, 264, 284, 366	1
4	215, 264, 284, 366, 388	1
5	215, 264, 356	2
6	215, 284	1
7	215, 284, 356	1
8	215, 284, 366	1
9	242	1
10	242, 284, 320	2
11	242, 284, 366, 388	1
12	242, 320, 356, 388, 486, 533, 587	1
13	242, 356	1
14	264	4
15	264, 284	3
16	264, 284, 320, 366	1
17	264, 284, 320, 388	1
18	264, 284, 356	3
19	264, 284, 366	14
20	264, 284, 366, 388	2
21	264, 284, 366, 406	1
22	264, 284, 366, 430, 453	1
23	264, 320, 366, 388	2
24	264, 356	17
25	264, 356, 388	5
26	264, 366	1
27	264, 366, 388	2
28	264, 366, 388, 406	2
29	264, 388	17
30	284	8
31	284, 320, 366	1
32	284, 320, 366, 388, 406	1
33	284, 320, 366, 406	1
34	284, 320, 388	1
35	284, 356	1
36	284, 366	5
37	284, 366, 453	1
38	284, 388	3
39	320, 366	3
40	356	9
41	356, 366	2
42	366	33
43	366, 430, 453	1
44	388	1

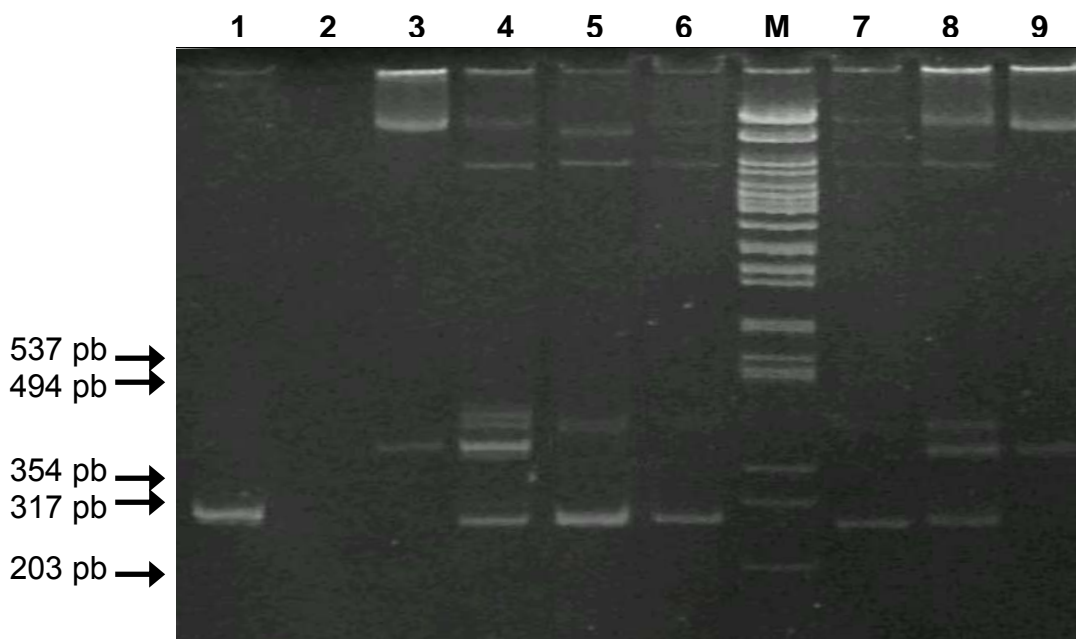


Figura 3: Padrões de fragmentos da amplificação da região intergênica 16S – 23S do rDNA de isolados de *Listeria* sp. 1, *L. monocytogenes* ATCC 15315 padrão 30; 2, controle negativo; 3, *L. seeligeri* padrão 42; 4, *L. monocytogenes* padrão 28, 5 e 6, *L. grayi* subsp. *grayi* padrão 29; M, marcador molecular λ (*Eco* RI, *Hind* III, *Cla* I); 7, *L. grayi* subsp. *grayi* padrão 29; 8, *L. seeligeri* padrão 27; 9, *L. seeligeri* padrão 42. Gel de poliacrilamida 8%.

L. monocytogenes, com 2 isolados na mesma amostra; e o padrão 14, à *L. grayi* subsp. *grayi*, encontrados em 4 isolados da mesma origem, um na marca A (inverno) e 3 na marca B (primavera). Os outros 5 padrões foram encontrados em *L. seeligeri*: padrão 20, 2 isolados na mesma amostra; padrão 23, 2 isolados na mesma amostra; padrão 25, 2 isolados na marca A (inverno) e 3 na marca B (primavera); padrão 40, um isolado na marca B (primavera) e 8 na marca A (inverno); padrão 41, 2 isolados na mesma amostra. A distribuição do número de isolados entre os 44 padrões de acordo com a estação do ano, marca e espécie é demonstrada na tabela 6.

Tabela 6: Distribuição dos padrões por espécie, marca, origem da amostra e estação do ano.

Estação	Coleta	Marca	Origem	Espécies	Padrão	Nº Isolados				
Inverno	Ago/04	A	POA/ RS*	<i>L. seeligeri</i>	25	1				
					30	1				
					42	1				
								<i>J. denitrificans</i>	6	1
									30	2
								<i>L. monocytogenes</i>	15	1
									28	2
								<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	14	1
				Primavera	Out/04	B	POA/ RS*	<i>L. seeligeri</i>	17	1
<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	14	3								
	29	15								
					<i>J. denitrificans</i>	15	1			
Nov/04	B	POA/ RS*			<i>L. seeligeri</i>	4	1			
						7	1			
						19	2			
						20	2			
						25	3			
						31	1			
						35	1			
						36	1			
				40		1				
									<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	10
Verão	Dez/04	A	POA/ RS*	<i>L. seeligeri</i>	12	1				

Tabela 6: Distribuição dos padrões por espécie, marca, origem da amostra e estação do ano (continuação).

Estação	Coleta	Marca	Origem	Espécies	Padrão	Nº Isolados			
Verão	Dez/04	A	POA/ RS*	<i>L. innocua</i>	1	2			
					5	1			
				<i>L. welshimeri</i>	15	1			
					16	1			
					<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	30	3		
						38	1		
				<i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	29	1			
					Jan/05	A	POA/ RS*	<i>L. monocytogenes</i>	30
				C					SJP/ PR**
					Fev/05	A	POA/ RS*	<i>L. innocua</i>	
<i>L. monocytogenes</i>	30	1							
	34	1							
	36	1							
B	<i>L. ivanovii</i>	9	1						
		Outono	Mar/05	A				POA/ RS*	<i>L. seeligeri</i>
42	1								
<i>L. ivanovii</i>	10				1				
	B			<i>L. monocytogenes</i>	38	1			
<i>L. welshimeri</i>					29	1			

Tabela 6: Distribuição dos padrões por espécie, marca, origem da amostra e estação do ano (continuação).

Estação	Coleta	Marca	Origem	Espécies	Padrão	Nº Isolados
Outono	Abr/05	A	POA/ RS*	<i>L. monocytogenes</i>	2	1
					19	1
					33	1
					39	2
				<i>L. seeligeri</i>	3	1
					11	1
					19	6
					21	1
					23	2
					26	1
		38	1			
		39	1			
		42	4			
		44	1			
		C	SJP/ PR**	<i>L. monocytogenes</i>	22	1
					36	1
					37	1
					42	2
					43	1
Inverno	Jun/05	A	POA/ RS*	<i>L. seeligeri</i>	8	1
					18	2
					19	5
					24	2
					27	1
					36	2
					40	6
					42	19
					<i>L. welshimeri</i>	27

Tabela 6: Distribuição dos padrões por espécie, marca, origem da amostra e estação do ano (continuação).

Estação	Coleta	Marca	Origem	Espécies	Padrão	Nº Isolados
Inverno	Jul/05	A	POA/ RS*	<i>Listeria</i> sp.	42	1
				<i>L. seeligeri</i>	24	1
					25	1
					40	2
					41	2
					42	5
	Ago/05	A	POA/ RS*	<i>L. ivanovii</i>	5	1
					13	1
					24	14

* Porto Alegre – RS

** São José dos Pinhais – PR

Essa variabilidade encontrada deve-se à quantidade de cópias, múltiplos operons, da região 16S – 23S – 5S do rDNA, existentes no genoma da *Listeria*. Segundo Glaser et al. (2001), *L. monocytogenes* e *L. innocua* contêm em torno de 6 operons rRNA. Esses operons podem não ter ou conter um ou mais tRNA na região espaçadora 16S – 23S do rDNA, conferindo fragmentos de tamanhos e seqüências diferentes (Jensen et al., 1993).

Todas as espécies compartilharam padrões: *L. innocua* e *L. grayi* (padrão 1); *L. innocua* e *L. ivanovii* (padrão 5); *L. ivanovii* e *L. grayi* (padrão 10); *L. monocytogenes*, *L. welshimeri* e *J. denitrificans* (padrão 15); *L. seeligeri* e *L. innocua* (padrão 18); *L. seeligeri* e *L. ivanovii* (padrão 24); *L. seeligeri* e *L. welshimeri* (padrão 27); *L. welshimeri* e *L. grayi* (padrão 29); *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. grayi* e *J. denitrificans* (padrão 30); *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. grayi* (padrão 38); *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *Listeria* sp.

(padrão 42) e, compartilhando o maior número de padrões, *L. monocytogenes* e *L. seeligeri* (padrões 19, 36 e 39). Esta observação confirma que este marcador molecular, com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho, não é espécie-específico para *Listeria*. O gênero *Jonesia* compartilhou padrões com 4 espécies de *Listeria*, o que indica que esta região pode ter mesmo tamanho em gêneros afins. Todavia, Jensen et al. (1993), utilizando oligonucleotídeos iniciadores universais para esta região e aplicando eletroforese em gel de poliacrilamida 4%, obtiveram fragmentos específicos a cada espécie de *Listeria* sp. através do polimorfismo da região intergênica 16S- 23S do rDNA, podendo fazer identificação das espécies.

Foram encontrados 47 padrões na marca A, 17 padrões na marca B e 6 padrões na marca C (Tabela 6). As marcas A e B compartilharam padrões para *L. grayi* (padrão 14) e *L. seeligeri* (padrões 19, 25, 36 e 40). Isso pode ser explicado por essas duas marcas serem da mesma origem (Porto Alegre – RS). As marcas A e C compartilharam o padrão 36 para *L. monocytogenes* (2 isolados, um de cada marca). Marcas B e C não compartilharam padrões. A ocorrência do mesmo perfil genotípico entre os isolados, e de procedência distinta, sugere o envolvimento da mesma linhagem na contaminação dos diferentes produtos. Porém, não se pode afirmar se é uma linhagem recém dispersa ou se é uma linhagem comum adaptada. Autio et al. (2002) analisaram 295 *L. monocytogenes* isoladas de diversos tipos de alimentos de 41 produtores diferentes, durante os anos de 1988-1999. Utilizando PFGE, *Apa I* e *Asc I*, dos 66 diferentes padrões, um mesmo padrão foi detectado em produtos do mesmo produtor durante alguns anos. Entretanto, 17 padrões

foram detectados em alimentos de mais de um produtor, como também em diferentes tipos de alimentos, sem relação aparente. Alguns isolados que possuíam o mesmo padrão foram provenientes de alimentos de diferentes países e em diferentes anos.

Independente da espécie, as duas diferentes origens das amostras, Porto Alegre – RS e São José dos Pinhais – PR, compartilharam 3 padrões (1, 36 e 42), sendo o 42, o mais freqüente entre os isolados. Esse padrão apareceu em 2 isolados de *L. monocytogenes* da mesma amostra da marca C em São José dos Pinhais – PR e em 30 isolados de *L. seeligeri* de 6 amostras diferentes da marca A, nos períodos de baixas temperaturas (outono e inverno de 2004 e 2005). Essa linhagem mostrou-se reincidente, possivelmente mantendo-se durante um ano na planta de processamento da marca A, prevalecendo e recontaminando as amostras nos meses frios. Reincidência também foi observada por Waak et al. (2002), analisando a presença de *L. monocytogenes* em leite cru na Suíça, através do método de eletroforese em campo pulsado (PFGE), obtendo 16 padrões, dos 65 isolados de *L. monocytogenes*. Dois padrões foram encontrados tanto no leite coletado na fazenda, quanto no coletado na planta de beneficiamento, e um mesmo padrão foi encontrado 10 vezes, em coletas diferentes, no período de 10 meses. Aguado et al. (2004), investigando a origem e as rotas da disseminação por *Listeria* em uma planta de processamento de vegetais congelados, através da análise de restrição por endonuclease (REA) e RAPD, encontraram um mesmo padrão em amostras diferentes na mesma planta de processamento, sugerindo esta última como principal fonte de disseminação.

A reincidência também foi observada em outras linhagens. *L. seeligeri* padrão 24, reincidiram na marca A em coletas diferentes no inverno. O padrão 25 de *L. seeligeri* foi reincidente no inverno (de 2004 e 2005) e na primavera, em marcas diferentes (A e B), mas de mesma origem (Porto Alegre – RS). *L. seeligeri*, padrão 19, apareceu na primavera na marca B e voltou a aparecer no outono e inverno na marca A. *L. seeligeri*, padrão 40, também apareceu na marca B na primavera e voltou a aparecer no inverno na marca A, sendo esses padrões comuns na origem das amostras. O padrão 30, encontrado em *L. monocytogenes*, mostrou ser reincidente na marca A no verão. Talvez essa linhagem tenha entrado na planta de processamento em Janeiro, e contaminado as amostras no mês subsequente. Kabuki et al. (2004), através da ribotipificação, também encontraram um padrão de *L. monocytogenes* reincidente, isolado de várias amostras da mesma planta de processamento de queijo, durante 6 meses de coleta. Utilizando PFGE, Senczek et al. (2000) obtiveram 15 padrões dos 89 isolados de *L. monocytogenes*. Um mesmo padrão de *L. monocytogenes* foi encontrado em 2 áreas diferentes da planta de processamento e no produto final, indicando contaminação cruzada. Além disso, esse padrão foi encontrado repetidamente durante dois anos nas mesmas áreas da planta de processamento. Este resultado indicou a persistência e habilidade do isolado em sobreviver e adaptar-se na área de processamento por um longo período.

O padrão encontrado para o único isolado de *L. grayi* subsp. *murrayi* (marca A no verão) foi o mesmo encontrado para 15 isolados de *L. grayi* subsp. *grayi* da marca B na primavera (padrão 29). Essas duas bactérias são

intimamente relacionadas, o que pode explicar esse padrão em comum acontecendo na mesma origem das amostras. Os padrões 22, 37 e 43, encontrados para *L. monocytogenes* marca C, provavelmente são linhagens adaptadas àquela região.

Essa diversidade apresentada em *Listeria* também é encontrada utilizando-se outros métodos. Pimenta et al. (1999), utilizando o método de ribotipificação, obtiveram 6 padrões diferentes para 30 isolados de *L. monocytogenes*. Byun et al. (2001), aplicando polimorfismo do fragmento amplificado ao acaso (RAPD), observaram 40 padrões de fragmentos nos 54 isolados de *L. monocytogenes*. E, com esse resultado bastante variado, puderam verificar similaridade entre isolados de carne produzida no país (Coréia) e carne importada.

A diversidade encontrada no presente trabalho pode ser explicada pelos vários fatores envolvidos na contaminação, como solo, adubo, água de irrigação e lavagem, que podem ser diferentes tanto nas marcas, como nas origens, e que podem alterar durante as estações, conferindo uma contaminação não pontual.

4.4.2. Análise do dendrograma

No dendrograma (Figura 4) pode-se visualizar a variabilidade da região intergênica 16S – 23S do rDNA entre os isolados analisados.

O dendrograma apresentou 22 pequenos grupamentos (de 2 a 8 isolados) com nível de similaridade superior ou igual a 70%. Treze padrões ficaram isolados, agrupando-se em um índice de similaridade menor que 70%.

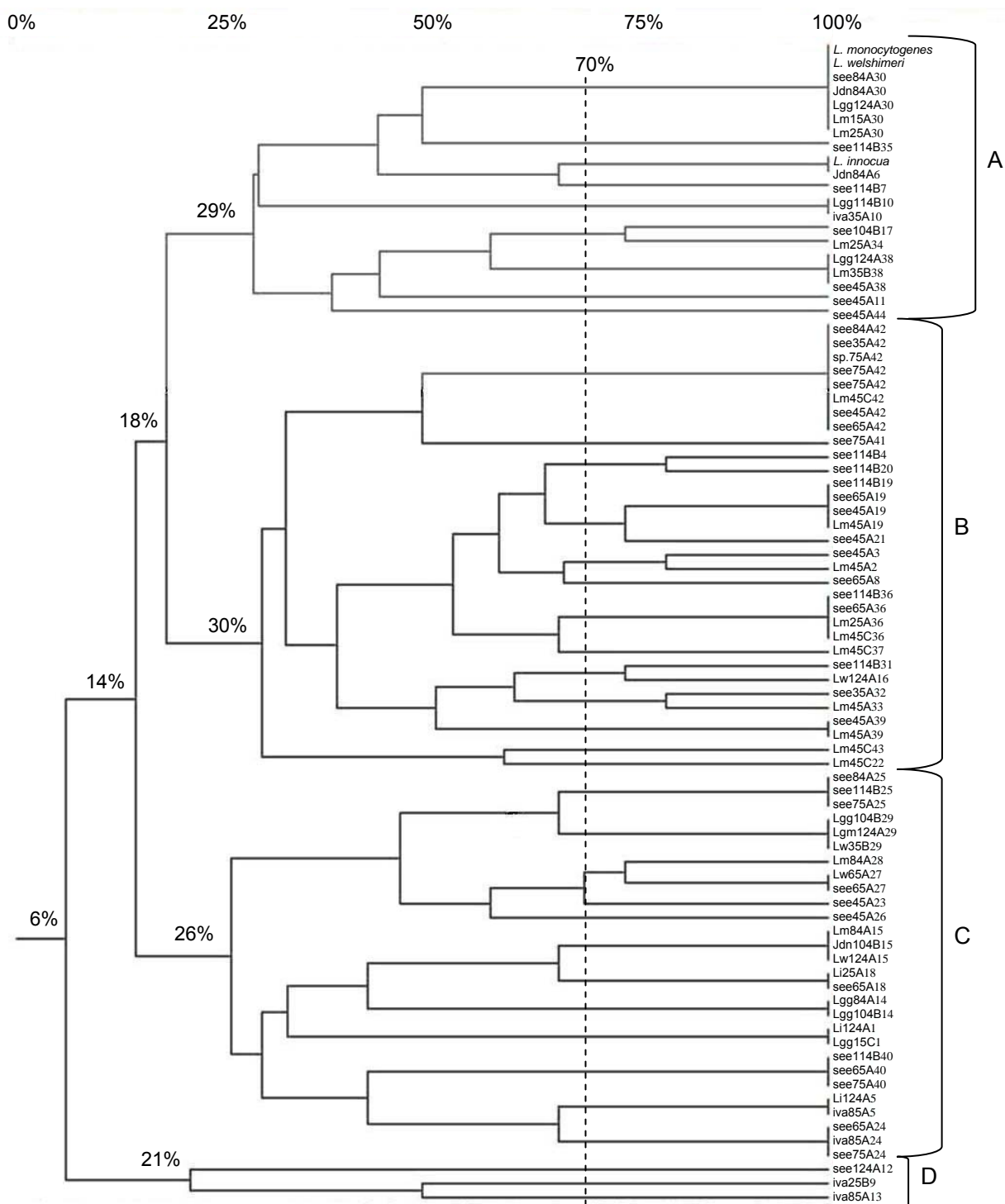


Figura 4: Dendrograma baseado na análise da amplificação da região intergênica 16S – 23S do rDNA dos isolados de *Listeria* e *Jonesia*. Os valores das ramificações e a régua indicam os valores de similaridade dos grupamentos que foram formados. Cada isolado representa o padrão de determinada espécie em uma amostra. Em amostras diferentes, a mesma espécie com o mesmo padrão é representada com outro código. De cada código: letras iniciais indicam a espécie (see – *L. seeligeri*, Lm – *L. monocytogenes*, Lw – *L. welshimeri*, iva – *L. ivanovii*, Li – *L. innocua*, Lgg – *L. grayi* subsp. *grayi*, Lgm – *L. grayi* subsp. *murrayi*, Jdn – *J. denitrificans*), o número que as seguem indica mês e ano da coleta (84 – agosto de 2004, 104 – outubro de 2004, 114 – novembro de 2004, 124 dezembro de 2004, 15 – janeiro de 2005, 25 – fevereiro de 2005, 35 – março de 2005, 45 – abril de 2005, 65 – junho de 2005, 75 – julho de 2005 e 85 – agosto de 2005), a próxima letra se refere a marca da amostra e o último número se refere ao padrão. As espécies escritas por extenso indicam os isolados de referência.

Isso corresponde a padrões únicos, porém um deles (padrão 41) corresponde a 2 isolados de mesma amostra.

Foram observados 4 grandes grupos A, B, C e D. Todos os isolados do grupo A agruparam-se em 29% de similaridade, os do grupo B, com 30% de similaridade e os do C, com 26% de similaridade. No grupo D são encontrados apenas 3 padrões, que se agruparam em 21% de similaridade. Os 4 grupos se unem em 6% de similaridade. *L. seeligeri*, com padrões bem variados, é encontrada nos 4 grupos. Os grupos observados no dendrograma não seguem uma regra geral, o que caracteriza grande diversidade entre os isolados. Não foi observado grupo de uma mesma espécie, logo este método não é eficiente para esta diferenciação. Fuentefria (2004), analisando a região intergênica 16S – 23S do rDNA de *Enterococcus* sp., não conseguiu diferenciar os isolados por espécie, mas conseguiu diferenciá-los por origem. Meijer et al. (1997), só conseguiu diferenciar os 26 isolados de 4 espécies de *Chlamydia* depois de clivar os fragmentos amplificados da região intergênica 16S – 23S do rRNA.

Devido a grande quantidade de isolados analisados (88), *L. seeligeri* foi a espécie que melhor pode ser avaliada quanto aos seus padrões. Essa espécie foi a que mais agrupou entre si (8 grupamentos), mostrando similaridade genética. Foram observados também grupamentos (10) entre as espécies *L. monocytogenes* e *L. seeligeri*, sendo essas as espécies que mais se agruparam. Desses 10 grupamentos, 8 aconteceram com isolados de mesma marca (A). Essa observação sugere que essas duas espécies sejam geneticamente relacionadas. Gall (2001), analisando a variabilidade genética

através da clivagem com *AluI* e *RsaI* do rDNA 16S entre *Listeria* isoladas de água, também ressaltou o agrupamento entre *L. seeligeri* e *L. monocytogenes*.

Algo similar também aconteceu com os isolados de *L. ivanovii* nos dois trabalhos. Dos 11 isolados de *L. ivanovii*, analisados por Gall (2001), 10 agruparam-se em um nível de similaridade maior que 70% e um isolado mostrou ser bem distinto dos demais com similaridade menor. No presente trabalho, as *L. ivanovii* também mostraram ser distintas, pois dos 5 padrões encontrados (tabela 4) nenhum agrupou entre si, sendo 2 bem distintas (iva25B9 e iva85A13), agrupando às outras em nível de 6% de similaridade.

Os isolados de *L. monocytogenes* da marca C, como já afirmado, foram bem distintos. Os 5 padrões estão no grupo B e agruparam-se em nível de similaridade inferior a 70%.

Algo interessante de se notar é o agrupamento de *J. denitrificans* com os isolados de referência *L. monocytogenes* ATCC 15315, *L. innocua* ATCC 33090 e *L. welshimeri*. Isso também foi observado por Gall (2001), onde 2 isolados de *J. denitrificans* agruparam-se com 5 isolados de *L. innocua*, incluindo a linhagem de referência.

No presente trabalho, pode ser observado *L. grayi* agrupando-se com outras espécies de *Listeria*. Vaneechoutte et al. (1998), analisando isolados de *Listeria* sp., utilizando 4 métodos baseados na PCR, entre eles a amplificação da região intergênica 16S – 23S rDNA, mostraram alta similaridade genética entre as espécies de *Listeria*, e homogeneidade entre *L. grayi* e as demais espécies de *Listeria*. A análise da região intergênica 16S-23S do rDNA sozinha conferiu uma grande variabilidade entre as espécies, gerando

27 padrões, e não sendo possível agrupar por espécie. No entanto, Allerberger (2003), baseado em resultados de hibridização, multilocus enzimático e seqüenciamento do 16S rRNA, observou que as seis espécies de *Listeria* são subdivididas em duas descendências: a) *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* e *L. seeligeri*, e b) *L. grayi*. E Graham et al. (1997), analisando a seqüência dos fragmentos amplificados da região intergênica 16S-23S do rDNA de isolados de *Listeria* sp., também observaram homologia entre as 5 espécies *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. monocytogenes*. *L. grayi* mostrou similaridade com as outras espécies em nível inferior a 70%.

O presente estudo encontrou uma grande diversidade entre os isolados. Esse método, considerado simples, mostrou-se útil para discriminar isolados de mesma espécie, podendo ser utilizado tanto para investigação de surtos e fontes de contaminação, como para verificação da diversidade genética inter e intra-específicas. O conhecimento da distribuição dos isolados tanto em uma planta de processamento como nos alimentos, auxilia nos procedimentos que devem ser implantados na higiene para produção de alimentos seguros.

5. CONCLUSÕES

1. As amostras apresentaram alta frequência de *Listeria* sp. e *L. monocytogenes*. Por ser um alimento pronto para consumo, as amostras não deveriam conter o patógeno, garantindo a inocuidade das mesmas.

2. Foi observada maior incidência de *Listeria* sp. no verão. *L. seeligeri* mostrou ser a espécie predominante nas amostras, aparecendo principalmente nos meses frios (outono, inverno e primavera).

3. A amplificação da região intergênica 16S – 23S do rDNA de *Listeria* sp. demonstrou grande diversidade entre os isolados, gerando 44 padrões. Todos os isolados amplificaram, mostrando ser esse método aplicável à *Listeria* sp. Todavia não foi possível agrupar os isolados por espécie, devido a grande diversidade de padrões gerados.

4. Foram observadas linhagens reincidentes nas amostras analisadas, demonstrando que estas estão estabelecidas na planta de processamento ou reincidentem através da matéria-prima, uma vez que aparecem em marcas diferentes, porém de mesma origem.

5. As *L. monocytogenes* da marca C, do Paraná, mostraram ser bem distintas das demais. Os isolados da marca A e B, de mesma origem, agruparam-se entre si no dendrograma (9). Este resultado mostra que as

linhagens também apresentam um padrão geográfico, ou seja, estão estabelecidas no local de origem da amostra.

6. PERSPECTIVAS

1. Identificar, através de métodos moleculares, os isolados de *Listeria* sp. não-identificados pelos testes bioquímicos.
2. Utilizar outro marcador molecular na caracterização dos isolados visando agrupá-los por espécie, marca ou origem.
3. Analisar a ocorrência de *Listeria* sp. e caracterizar geneticamente os isolados coletados numa planta de processamento de vegetais minimamente processados, visando auxiliar na descoberta e eliminação de rotas de contaminação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABED, Y. et al. Efficient discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by 16S-23S spacer region-based random amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, n.5. p.1418-1420, 1995.

AGUADO, V.; VITAS, A. I.; GARCIA-JALÓN, I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.90, p.341-347, 2004.

ALLENDE, A.; AGUAYO, E.; ARTÉS, F. Microbial and sensory quality of commercial fresh processed red lettuce throughout the production chain and shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.91, p.109-117. 2004.

ALLERBERGER, F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v.35, p.183-189. 2003.

ANTÓN, A. I.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. J.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Sequence diversity in the 16S-23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons in representatives of *Escherichia coli* ECOR collection. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.47, p.67-72, 1998.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução**: RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o: Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=144>. Acesso em: 08 mai. 2004.

AUSUBEL, M. F. et al. **Short Protocols in Molecular Biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology**. 2. ed. New York: J. Wiley, 1991.

AUTIO, T. et al. Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.77, p.83-90, 2002.

AYÇIÇEK, H.; SARIMEHMETOGLU, B.; ÇAKIROGLU, S. Assessment of microbiological quality of meals sample at the meal serving units of a military hospital in Ankara, Turkey. **Food Control**, Guildford, v.15, p.379-384, 2004.

BARRIGA, M. I. et al. Microbial changes in shredded iceberg lettuce stored under controlled atmospheres. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n.6, p.47-58, 1991.

BERBARI, S. A. G.; PASCHOALINO, J. E.; SILVEIRA, N. F. A. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.2, p.197-201, 2001.

BERRANG, M. E.; BRACKETT, R. E.; BEUCHAT, L. R. Growth of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under controlled atmosphere. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 52, p. 702-705, 1989.

BEUCHAT, L. R. *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. **Food Control**, Guildford, v.7, n.4/5, p.223-228, 1996.

BEUCHAT, L. R.; BRACKETT, R. E. Growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging, temperature and time. **Journal of Food Science**, Chicago, v.55, p.755-758, 1990.

BILLE, J.; ROCOURT, J.; SWAMINATHAN, B. *Listeria*, *Erysipelothrix*, and *Kurthia*. In: MURRAY, P. R. et al. **Manual of clinical microbiology**. 7. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. p.346-352.

BRACKETT, R. E. Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.50, p.999-1003, 1987.

BUCK, J. W.; WALCOTT, R. R.; BEUCHAT, L. R. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. **Plant Health Progress** doi: 10.1094/PHP – 2003 – 0121 – 01 – RV. 2003. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/online/feature/safety/Buck.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2005.

BYUN, S.-K.; JUNG, S. C.; YOO, H. S. Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.69, p.227-235, 2001.

CHITARRA, M. I. F. **Pós-colheita de Frutos e Hortalças**: Fisiologia e Manuseio. Lavras: Faepe, 1990. 293p.

CILIA, V.; LAFAY, B.; CHRISTEN, R. Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.13, n.3, p.451-461, 1996.

CLEMENTINO, M. M. et al. PCR analysis of tRNA intergenic spacer, 16S-23S internal transcribed spacer, and random amplified relationships of *Enterobacter cloacae* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, p.3865-3870, 2001.

CURTIS, M. L. de; FRANCESCHI, O.; DE CASTRO, N. *Listeria monocytogenes* en vegetales minimamente procesados. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.52, n.3, p.282-288, 2002.

DE ROEVER, C. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. **Food Control**, Guildford, v.9, n.6, p.321-347, 1998.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.55, n.3, p.476-511, 1991.

FARBER, J. M.; SANDERS, G. W.; JOHNSTON, M. A. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. **Journal Food Protection**, Iowa, v.52, p.456-458, 1989.

FARBER, J. M., WARBURTON, D. W., BABIUK, T. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. **Health Protection Branch – MFHPB-30 – Government of Canadá, Canadá, MFHPB-30**, 16p. 1994.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

FLESSA, S.; LUSK, D. M.; HARRIS, L. J. Survival of *Listeria monogytogenes* on fresh and frozen strawberries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.101, p.255-262, 2005.

FRANCIS, G. A.; THOMAS, C.; O'BEIRNE, D. The microbiological safety of minimally processed vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.34, p.1-22, 1999.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FUENTEFRIA, D. B. **Caracterização molecular de isolados de *Enterococcus* spp. através da amplificação e clivagem da região intergênica 16S – 23S do rDNA**. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 157 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

GALL, M. C. **Caracterização dos isolados de *Listeria* spp. através da análise do DNA ribossomal 16S**. Porto Alegre: UFRGS, 2001. 92 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

GARCÍA-MARTÍNEZ, J. et al. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.36, p.55-64, 1999.

GENDEL, S. M. Riboprint analysis of *Listeria monocytogenes* isolates obtained by FDA from 1999 to 2003. **Food Microbiology**, London, v.21, p.187-191, 2004.

GLASER, P. et al. Comparative genomics of *Listeria* species. **Science**, Washington, v.294, p.849-852, 2001.

GLEESON, E.; O'BEIRNE, D. Effects of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. **Food Control**, Guildford, v.16, p.677-685, 2005.

GRAHAM, T. A. et al. Inter- and intraspecies comparison of the 16S-23S rRNA operon intergenic spacer regions of six *Listeria* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v.47, n.3, p.863-869, 1997.

GRAVES, L. M. et al. Microbiological aspects of the investigation that traced the 1998 outbreak of listeriosis in the United States to contaminated hot dogs and establishment of molecular subtyping-based surveillance for *Listeria monocytogenes* in the PulseNet Network. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.43, n.5, p.2350-2355, 2005.

GUERRA, M. M.; MC LAUHLIN, J.; BERNARDO, F. A. *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. **Food Microbiology**, London, v.18, p.423-429, 2001.

HA, K. –S. et al. Incidence and polymerase chain reaction assay of *Listeria monocytogenes* from raw milk in Gyeongnam Province of Korea. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.65, n.1, p.111-115, 2002.

HARVEY, J.; GILMOUR, A. Occurrence and characteristics of *Listeria* in foods produced in Northern Ireland. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.19, p.193-205, 1993

HITCHINS, A. D. *Listeria monocytogenes*. In: **Bacteriological Analytical Manual**. 8. ed. 2003. Cap. 10. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>>. Acesso em: 13 mar. 2004.

ICMSF – International Commission on Microbiological specifications for foods. **APPCC Na Qualidade e Segurança Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997. 377p.

JARADAT, Z. W.; SCHUTZE, G. E.; BHUNIA, A. K. Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meat products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.76, p.1-10, 2002.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JENSEN, M. A.; WEBSTER, J. A.; STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of Polymerase Chain Reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.4, p.945-952, 1993.

JOFRÉ, A. et al. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. **Food Microbiology**, London, v.22, p.109-115, 2005.

JOHANNESSEN, G. S.; LONCAREVIC, S.; KRUSE, H. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.77, p.199-204, 2002.

JOHANSSON, T. Enhanced detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* from foodstuffs and food-processing environments. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.40, p.77-85, 1998.

KABUKI, L. Y. et al. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in Latin-Style fresh-cheese processing plants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, p.2803-1812, 2004.

KANEKO, K. et al. Bacterial contamination of ready-to-eat foods and fresh products in retail shops and food factories. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.62, n.6, p.644-649, 1999a.

KANEKO, K. et al. Bacterial contamination in the environment of food factories processing ready-to-eat fresh vegetables. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.62, n.7, p.800-804, 1999b.

KEROUANTON, A. et al. Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.43, p.61-71, 1998.

KOSEKI, S.; ISOBE, S. Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.104, n.3, p.239-248, 2005.

LIN, C.-M.; FERNANDO, S. Y.; WEI, C.-i. Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in vegetable salads. **Food Control**, Guildford, v.7, n.3, p.135-140, 1996.

LUZ, S. P. et al. Variation of the ribosomal operon 16S-23S gene spacer region in representatives of *Salmonella enterica* subspecies. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.180, p.2144-2151, 1998.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria**. 3. ed. Baltimore: Williams& Wilkins, 2000. 912p.

MADDEN, J. P. Microbial pathogens in fresh produce – the regulatory perspective. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.55, p.821-823, 1992.

MAISTRO, L. C. Alface minimamente processada: Uma revisão. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.14, n.3, p.219-224, 2001.

MARTINEZ, J. et al. Genetic variability among isolates of *Listeria monocytogenes* from products, clinical samples and processing environments, estimated by RAPD typing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.84, p.285-297, 2003.

MEIJER, A. et al. Species identification of *Chlamydia* isolates by analyzing restriction fragment length polymorphism of the 16S-23S rDNA spacer region. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.5, p.1179-1183, 1997.

MENA, C. et al. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**, London, v.21, p.213-216, 2004.

MEREGHETTI, L. et al. Combined ribotyping and random multiprimer DNA analysis to probe the population structure of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.6, p.2849-2857, 2002.

MÜLLER, G. **Microbiología de los Alimentos Vegetales**. Zaragoza: Acribia, 1981. 291p.

NAGPAL, M. L.; FOX, K. F.; FOX, A. Utility of 16S-23S rRNA spacer region methodology: how similar are interspace regions within a genome and between strains for closely related organisms?. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.33, p.211-219, 1998.

NG, D. L. K.; SEAH, H. L. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from a range of foods in Singapore. **Food Control**, Guildford, v.6, n.3, p.171-173, 1995.

NGUZ, K. et al. Microbiological evaluation of fresh-cut organic vegetables produced in Zâmbia. **Food Control**, Guildford, v.16, p.623-628, 2005.

NORTON, D. M. et al. Molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish processing industry. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.1, p.198-205, 2001.

PIANTA, C. et al. Presença de *Listeria* sp. em queijos artesanais tipo Colonial no Rio Grande do Sul. **Veterinária em Foco**, Canoas, v.2, n.1, p.5-14, 2004.

PIMENTA, F. C. et al. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from foods. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.30, p.356-361, 1999.

PINTO, M. et al. Comparison of Oxford Agar, PALCAM and *Listeria monocytogenes* Blood Agar for the recovery of *L. monocytogenes* from foods and environmental samples. **Food Control**, Guildford, v.12, p.511-514, 2001.

REIJ, M. W.; DEN AANTREKKER, E. D.; ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.91, p.1-11, 2004.

ROCOURT, J. Risk factors for listeriosis. **Food Control**, Guildford, v.7, n.4/5, p.195-202, 1996.

ROSA, O. O.; CARVALHO, E. P. Características Microbiológicas de Frutos e Hortaliças Minimamente Processados. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.34, n.2, p.84-92, 2000.

RYSER, E. T. Public Health Concerns. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**. New York: Marcel Dekker Inc., 1998. p.323-332.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Springs Harbor Laboratory Press, 1989.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L. et al. **Embalagens com Atmosfera Modificada**. Campinas: CETEA, 1996. 114p. Cap.1: Princípios da tecnologia de acondicionamento em embalagens com atmosfera modificada.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. et al. Avaliação de embalagens de hortaliças folhosas minimamente processadas do mercado brasileiro. **Anais do XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Fortaleza, v. 1, p.1.13, 2000. Trabalho apresentado no XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2000, Fortaleza, CE.

SCHLECH, W. F. Overview of listeriosis. **Food Control**, Guildford, v.7, n.4/5, p.183-186, 1996.

SEELIGER, H. P. R.; JONES, D. *Listeria*. In: SNEATH, P. H. A. (Coord.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. 2v. p.1235-1245.

SENCZEK, D.; STEPHAN, R.; UNTERMANN, F. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.62, p.155-159, 2000.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Editora Livraria Varela Ltda, 2001. 317p.

SOMER, L. et al. Amplified intergenic locus polymorphism as a basis for bacterial typing of *Listeria* spp. and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.6, p.3144-3152, 2005.

STROM, M. S. Phenotypic and genetic characterization of a non-hemolytic variant of *Listeria monocytogenes* from cold-smoked salmon. **Food Microbiology**, London, v.15, p.329-337, 1998.

THOMAS, C.; PRIOR, O.; O'BEIRNE, D. Survival and growth of *Listeria* species in a model ready-to-use vegetable product containing raw and cooked ingredients as affected by storage temperature and acidification. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.34, p.317-324, 1999.

THUNBERG, R. L. et al. Microbial Evaluation of Selected Fresh Produce Obtained at Retail Markets. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.65, n.4, p.677-682, 2002.

TOTH, I. K.; AVROVA, A. O.; HYMAN, L. J. Rapid identification and differentiation of the soft rot *Erwinias* by 16S-23S intergenic transcribed spacer – PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, p.4070-4076, 2001.

USDA – United States Department of Agriculture. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg, and Environmental Samples. **Laboratory Guidebook**. MGL8.04, 2005. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/index.as>. Acesso em: 22 jan. 2006.

VANEECHOUTTE, M. et al. Comparison of PCR-based DNA fingerprinting techniques for the identification of *Listeria* species and their use for atypical *Listeria* isolates. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v.48, p.127-139, 1998.

WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M.–L. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains and in dairy plant receiving

tanks. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.7, p.3366-3370, 2002.

WANG, R.-F.; CAO, W.-W.; CERNIGLIA, C. E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.83, p.727-736, 1997.

YAN, W. et al. Comparison of the hydrophobic grid-membrana filter DNA probe method and the Health Protection Branch standard method for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.30, p.379-384, 1996.

ZHANG, S.; FARBER, J. M. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. **Food Microbiology**, London, v.13, p.311-321, 1996.

8. APÊNDICE

8.1. Meios de Cultivo

8.1.1. Ágar Conservação

Meio para conservação dos isolados.

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	10,0 g
Cloreto de sódio	8,0 g
Fosfato de sódio bibásico	2,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1000 mL

Misturar todos o ingredientes, menos o ágar, ajustar o pH para 7,5.

Acrescentar o ágar e esterilizar a 121 °C, 1 atm, por 15 minutos.

8.1.2. Caldo Vermelho de Metila – Voges Proskauer

Meio para teste bioquímico de Vermelho de Metila e Voges

Proskauer

Peptona	7,0 g
Glicose	5,0 g
Fosfato dipotássico (K ₂ HPO ₄)	5,0 g
Água destilada	1000 mL

Dissolver os ingredientes na água destilada, acertar o pH para 6,9,

distribuir em tubos e esterilizar a 121 °C, 1 atm, por 15 minutos.

8.1.3. Caldo Púrpura Base

Meio base para teste bioquímico de fermentação de carboidratos.

Peptona	10,0 g
Extrato de carne	1,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Púrpura de bromocresol	2 mL da solução 1%
Água destilada	1000 mL

Dissolver os ingredientes da base, ajustar o pH em 6,8 e esterilizar a 121 °C, 1 atm, por 15 minutos. Separadamente, preparar uma solução 10% do carboidrato a ser testado e esterilizar por filtração. Adicionar assepticamente 0,5 mL da solução do carboidrato em 100 mL de meio base. Distribuir em tubos estéreis.

8.1.4. Caldo Nitrato

Meio para teste bioquímico de redução de nitrato.

Peptona	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Nitrato de potássio (KNO ₃)	1,0 g
Água destilada	1000 mL

Dissolver os ingredientes, ajustar o pH para 7,0, distribuir em tubos e esterilizar a 121 °C, 1 atm, por 15 minutos.

8.2: Relação dos isolados, alguns testes bioquímicos, código api® Listeria, padrão e código do dendrograma.

Mês	Salada	Isolado	VM	VP	Nitrato	Açúcares			Identificação	H / CAMP	Cód. api® Listeria	Cód. Padrão	Cód. dendrograma
						Ram	Xil	Man					
Ago/04	A1	L3OX4	-	+	-	+	+	-	<i>L. welshimeri</i> – NR	-	-	-	-
Ago/04	A1	L3OX9	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	42	see84A42
Ago/04	A1	L3P7	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	30	see84A30
Ago/04	A1	L3P9	+	+	+	-	+	-	<i>J. denitrificans</i>	-	-	30	Jdn84A30
Ago/04	A1	L3P10	+	+	+	-	+	-	<i>J. denitrificans</i>	-	-	30	-
Ago/04	A1	L3P12	+	-	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	25	see84A25
Ago/04	A1	L3P14	+	+	+	-	+	-	<i>J. denitrificans</i>	-	-	6	Jdn84A6
Ago/04	A2	L4OX1	+	+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> *	<i>S. aureus</i>	6610	15	Lm84A15
Ago/04	A2	L4OX2	-	-	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> *	<i>S. aureus</i>	6610	28	Lm84A28
Ago/04	A2	L4P1	+	+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> *	<i>S. aureus</i>	6610	28	-
Ago/04	A2	L4P4	+	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	14	Lgg84A14
Out/04	B1	L12-1.3	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	17	see104B17
Out/04	B1	L12M1	-	+	-	-	+	-	<i>L. welshimeri</i> – NR	-	-	-	-
Out/04	B1	L12M3	+	+	+	-	+	-	<i>J. denitrificans</i>	-	-	15	Jdn104B15
Out/04	B1	L12P1	+	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	14	Lgg104B14
Out/04	B1	L12P3	+	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	14	-
Out/04	B1	L12P6	+	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	14	-
Out/04	B1	L12P7	+	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	29	Lgg104B29
Out/04	B1	L12P9	+	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	29	-
Out/04	B1	L12P11	+	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	29	-

8.2: Relação dos isolados, alguns testes bioquímicos, código api® Listeria, padrão e código do dendrograma (Continuação).

Mês	Salada	Isolado	VM	VP	Nitrato	Açúcares			Identificação	H / CAMP	Cód. api® Listeria	Cód. Padrão	Cód. dendrograma
						Ram	Xil	Man					
Out/04	B1	L12P12	+	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	29	-
Out/04	B1	L12P14	+	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	29	-
Out/04	B1	L12P15	+	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	29	-
Out/04	B1	L12P16	+	-	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	29	-
Out/04	B1	L12P17	+	-	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	29	-
Out/04	B1	L12P18	+	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	29	-
Out/04	B1	L12P19	+	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	29	-
Out/04	B1	L12P20	+	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	29	-
Out/04	B1	L12P21	+	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	29	-
Out/04	B1	L12P22	+	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	29	-
Out/04	B1	L12P23	+	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	29	-
Out/04	B1	L12P25	+	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	29	-
Nov/04	B2	L16-1.25	-	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	10	Lgg114B10
Nov/04	B2	L16P1	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	25	see114B25
Nov/04	B2	L16P2	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	25	-
Nov/04	B2	L16P5	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	25	-
Nov/04	B2	L16P6	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	4	see114B4
Nov/04	B2	L16P7	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	20	see114B20
Nov/04	B2	L16P8	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	31	see114B31
Nov/04	B2	L16P9	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	20	-
Nov/04	B2	L16P10	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	7	see114B7

8.2: Relação dos isolados, alguns testes bioquímicos, código api® Listeria, padrão e código do dendrograma (Continuação).

Mês	Salada	Isolado	VM	VP	Nitrato	Açúcares			Identificação	H / CAMP	Cód. api® Listeria	Cód. Padrão	Cód. dendrograma
						Ram	Xil	Man					
Nov/04	B2	L16P11	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	40	see114B40
Nov/04	B2	L16P12	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	36	see114B36
Nov/04	B2	L16P13	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	19	see114B19
Nov/04	B2	L16P14	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	19	-
Nov/04	B2	L16P15	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	35	see114B35
Dez/04	A3	L18-1.4	-	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	30	Lgg124A30
Dez/04	A3	L18-1.5	-	-	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i> – NR	-	-	-	-
Dez/04	A3	L18M1	-	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	30	-
Dez/04	A3	L18M2	-	+	-	+	-	-	<i>L. innocua</i>	-	-	1	Li124A1
Dez/04	A3	L18M3	+	+	-	+	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	-	-	29	Lgm124A29
Dez/04	A3	L18M4	-	+	-	+	+	-	<i>L. welshimeri</i> – NR	-	-	-	-
Dez/04	A3	L18M7	-	+	-	+	+	-	<i>L. welshimeri</i>	-	-	15	Lw124A15
Dez/04	A3	L18M8	-	+	-	+	+	-	<i>L. welshimeri</i>	-	-	16	Lw124A16
Dez/04	A3	L18M10	-	+	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>	-	-	5	Li124A5
Dez/04	A3	L18M11	-	+	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>	-	-	1	-
Dez/04	A3	L18M13	-	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	30	-
Dez/04	A3	L18M18	-	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	12	see124A12
Dez/04	A1	L19-1.1	+	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	38	Lgg124A38
Dez/04	A1	L19-1.2	-	+	-	-	+	-	<i>L. welshimeri</i> – NR	-	-	-	-
Dez/04	A1	L19-1.3	-	+	-	-	+	-	<i>L. welshimeri</i> – NR	-	-	-	-
Jan/05	A2	L21-2.1	-	+	-	-	-	-	<i>L. innocua</i> – NR	-	-	-	-

8.2: Relação dos isolados, alguns testes bioquímicos, código api® Listeria, padrão e código do dendrograma (Continuação).

Mês	Salada	Isolado	VM	VP	Nitrato	Açúcares			Identificação	H / CAMP	Cód. api® Listeria	Cód. Padrão	Cód. dendrograma
						Ram	Xil	Man					
Jan/05	A1	L22P4	-	+	-	+	-	-	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	-	30	Lm15A30
Jan/05	C1	L24-1.1	-	+	-	-	-	+	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	1	Lgg15C1
Jan/05	C1	L24-1.3	-	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i> – NR	<i>S. aureus</i>	-	-	-
Fev/05	A2	L25-1.4	-	+	-	+	-	-	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	-	34	Lm25A34
Fev/05	A2	L25-1.5	-	+	-	+	-	-	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	-	36	Lm25A36
Fev/05	A2	L25-1.6	-	+	-	-	-	-	<i>L. innocua</i> – NR	-	-	-	-
Fev/05	A2	L25-2.1	-	+	-	+	-	-	<i>L. monocytogenes</i> – NR	<i>S. aureus</i>	-	-	-
Fev/05	A2	L25-2.2	-	+	-	+	-	-	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	-	30	Lm25A30
Fev/05	A2	L25-2.3	-	+	-	-	-	-	<i>L. innocua</i> – NR	-	-	-	-
Fev/05	A1	L26-1.2	-	+	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>	-	-	18	Li25A18
Fev/05	B1	L28M1	+	+	-	-	+	+	<i>L. ivanovii</i> *	hemolítica	2230	9	iva25B9
Mar/05	B3	L29P1	-	+	-	+	+	-	<i>L. welshimeri</i>	-	-	29	Lw35B29
Mar/05	B1	L30-2.1	+	+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> *	<i>S. aureus</i>	6610	38	Lm35B38
Mar/05	A2	L32M1	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	32	see35A32
Mar/05	A2	L32M2	+	+	-	+	+	+	<i>L. ivanovii</i> *	hemolítica	2220	10	iva35A10
Mar/05	A2	L32P1	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	42	see35A42
Abr/05	C1	L33M1	+	+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> *	<i>S. aureus</i>	6610	36	Lm45C36
Abr/05	C1	L33M6	+	+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> *	<i>S. aureus</i>	6610	42	Lm45C42
Abr/05	C1	L33M11	+	+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> *	<i>S. aureus</i>	6610	37	Lm45C37
Abr/05	C1	L33P11	+	+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> *	<i>S. aureus</i>	6610	42	-
Abr/05	C1	L33P13	+	+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> *	<i>S. aureus</i>	6610	43	Lm45C43

8.2: Relação dos isolados, alguns testes bioquímicos, código api® Listeria, padrão e código do dendrograma (Continuação).

Mês	Salada	Isolado	VM	VP	Nitrato	Açúcares			Identificação	H / CAMP	Cód. api® Listeria	Cód. Padrão	Cód. dendrograma
						Ram	Xil	Man					
Abr/05	C1	L33P16	+	+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> *	<i>S. aureus</i>	6610	22	Lm45C22
Abr/05	A3	L35M2	+	+	+	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	19	see45A19
Abr/05	A3	L35M6	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	23	see45A23
Abr/05	A3	L35M7	+	+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> *	<i>S. aureus</i>	6610	33	Lm45A33
Abr/05	A3	L35M9	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	19	-
Abr/05	A3	L35M14	+	+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> *	<i>S. aureus</i>	6610	19	Lm45A19
Abr/05	A3	L35M20	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	19	-
Abr/05	A3	L35M24	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	3	see45A3
Abr/05	A3	L35P1	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	23	-
Abr/05	A3	L35P4	+	+	+	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	19	-
Abr/05	A3	L35P6	+	+	+	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	19	-
Abr/05	A3	L35P8	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	21	see45A21
Abr/05	A3	L35P10	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	26	see45A26
Abr/05	A3	L35P14	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	42	see45A42
Abr/05	A3	L35P18	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	42	-
Abr/05	A3	L35P22	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	11	see45A11
Abr/05	A3	L35P24	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	39	see45A39
Abr/05	A3	L35P26	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	42	-
Abr/05	A3	L35P27	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	44	see45A44
Abr/05	A3	L35P28	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	38	see45A38

8.2: Relação dos isolados, alguns testes bioquímicos, código api® Listeria, padrão e código do dendrograma (Continuação).

Mês	Salada	Isoaldo	VM	VP	Nitrato	Açúcares			Identificação	H / CAMP	Cód. api® Listeria	Cód. Padrão	Cód. dendrograma
						Ram	Xil	Man					
Abr/05	A3	L35P29	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	42	-
Abr/05	A3	L35P30	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	19	-
Abr/05	A2	L36M1	+	+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> *	<i>S. aureus</i>	6610	2	Lm45A2
Abr/05	A2	L36M2	+	+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> *	<i>S. aureus</i>	6610	39	Lm45A39
Abr/05	A2	L36M3	+	+	-	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> *	<i>S. aureus</i>	6610	39	-
Mai/05	A1	L38M7	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i> – NR	<i>S. aureus</i>	-	-	-
Jun/05	A3	L43M1	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	42	see65A42
Jun/05	A3	L43M2	+	+	-	+	+	-	<i>L. welshimeri</i>	-	-	27	Lw65A27
Jun/05	A3	L43M3	+	-	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	27	see65A27
Jun/05	A3	L43P1	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	42	-
Jun/05	A3	L43P13	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	42	-
Jun/05	A3	L43P15	+	-	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	42	-
Jun/05	A3	L43P16	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	42	-
Jun/05	A3	L43P17	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	42	-
Jun/05	A3	L43P18	+	-	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	42	-
Jun/05	A3	L43P19	+	-	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	19	see65A19
Jun/05	A3	L43P20	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	19	-
Jun/05	A3	L43P21	+	-	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	40	see65A40
Jun/05	A3	L43P22	+	-	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	19	-
Jun/05	A3	L43P23	+	-	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	42	-
Jun/05	A3	L43P24	+	-	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	42	-

8.2: Relação dos isolados, alguns testes bioquímicos, código api® Listeria, padrão e código do dendrograma (Continuação).

Mês	Salada	Isolado	VM	VP	Nitrato	Açúcares			Identificação	H / CAMP	Cód. api® Listeria	Cód. Padrão	Cód. dendrograma
						Ram	Xil	Man					
Jun/05	A3	L43P25	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	19	-
Jun/05	A3	L43P26	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	40	-
Jun/05	A3	L43P27	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	42	-
Jun/05	A3	L43P30	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	40	-
Jun/05	A3	L43P33	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	19	-
Jun/05	A3	L43P34	+	-	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	40	-
Jun/05	A3	L43P35	+	-	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	42	-
Jun/05	A3	L43P36	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	42	-
Jun/05	A3	L43P37	+	-	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	18	see65A18
Jun/05	A3	L43P40	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	40	-
Jun/05	A3	L43P41	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	42	-
Jun/05	A3	L43P43	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	42	-
Jun/05	A3	L43P45	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	42	-
Jun/05	A3	L43P46	+	-	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	42	-
Jun/05	A3	L43P47	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	42	-
Jun/05	A3	L43P48	+	-	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	42	-
Jun/05	A3	L43P52	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	40	-
Jun/05	A3	L43P54	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	36	see65A36
Jun/05	A3	L43P56	+	-	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	36	-
Jun/05	A3	L43P57	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	42	-
Jun/05	A3	L43P59	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	8	see65A8

8.2: Relação dos isolados, alguns testes bioquímicos, código api® Listeria, padrão e código do dendrograma (Continuação).

Mês	Salada	Isolado	VM	VP	Nitrato	Açúcares			Identificação	H / CAMP	Cód. api® Listeria	Cód. Padrão	Cód. dendrograma
						Ram	Xil	Man					
Jun/05	A3	L43P60	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	24	see65A24
Jun/05	A3	L43P61	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	18	-
Jun/05	A3	L43P62	+	-	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	24	-
Jul/05	A3	L47P1	+	-	+	-	+	-	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	2200	24	see75A24
Jul/05	A3	L47P2	+	+	+	-	+	-	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	2200	25	see75A25
Jul/05	A3	L47P3	+	-	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	42	see75A42
Jul/05	A3	L47P4	+	-	+	+	+	-	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	2200	42	-
Jul/05	A3	L47P5	+	-	+	-	+	-	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	2200	40	see75A40
Jul/05	A3	L47P7	+	+	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>	<i>S. aureus</i>	-	40	-
Jul/05	A1	L48P4	+	-	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	42	see75A42
Jul/05	A1	L48P9	+	-	-	+	+	-	<i>L. welshimeri</i> – NR	-	-	-	-
Jul/05	A1	L48P11	+	-	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	42	-
Jul/05	A1	L48P12	+	-	+	+	+	+	<i>Listeria</i> sp. *	-	6600	42	sp.75A42
Jul/05	A1	L48P15	+	-	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	42	-
Jul/05	A1	L48P17	+	-	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	41	see75A41
Jul/05	A1	L48P18	+	+	-	-	+	+	<i>L. seeligeri</i> *	<i>S. aureus</i>	6200	41	-
Ago/05	A2	L51P13	+	+	-	-	+	+	<i>L. ivanovii</i> *	hemolítica	2230	24	iva85A24
Ago/05	A2	L51P19	+	+	-	-	+	+	<i>L. ivanovii</i> *	hemolítica	2230	13	iva85A13
Ago/05	A2	L51P20	+	+	-	-	+	+	<i>L. ivanovii</i> *	hemolítica	2230	24	-
Ago/05	A2	L51P21	+	+	-	-	+	+	<i>L. ivanovii</i> *	hemolítica	2230	24	-

8.2: Relação dos isolados, alguns testes bioquímicos, código api® Listeria, padrão e código do dendrograma (Continuação).

Mês	Salada	Isolado	VM	VP	Nitrato	Açúcares			Identificação	H / CAMP	Cód. api® Listeria	Cód. Padrão	Cód. dendrograma
						Ram	Xil	Man					
Ago/05	A2	L51P23	+	+	-	-	+	+	<i>L. ivanovii</i> *	hemolítica	2230	5	iva85A5
Ago/05	A2	L51P24	+	-	-	-	+	+	<i>L. ivanovii</i> *	hemolítica	2230	24	-
Ago/05	A2	L51P26	+	-	-	-	+	+	<i>L. ivanovii</i> – NR *	hemolítica	2230	-	-
Ago/05	A2	L51P27	+	-	-	-	+	+	<i>L. ivanovii</i> *	hemolítica	2230	24	-
Ago/05	A2	L51P28	+	+	-	-	+	+	<i>L. ivanovii</i> *	hemolítica	2230	24	-
Ago/05	A2	L51P29	+	+	-	-	+	+	<i>L. ivanovii</i> *	hemolítica	2230	24	-
Ago/05	A2	L51P30	+	+	-	-	+	+	<i>L. ivanovii</i> *	hemolítica	2230	24	-
Ago/05	A2	L51P31	+	+	-	-	+	+	<i>L. ivanovii</i> *	hemolítica	2230	24	-
Ago/05	A2	L51P32	+	+	-	-	+	+	<i>L. ivanovii</i> *	hemolítica	2230	24	-
Ago/05	A2	L51P35	+	+	-	-	+	+	<i>L. ivanovii</i> *	hemolítica	2230	24	-
Ago/05	A2	L51P36	+	+	-	-	+	+	<i>L. ivanovii</i> *	hemolítica	2230	24	-
Ago/05	A2	L51P37	+	-	-	-	+	+	<i>L. ivanovii</i> *	hemolítica	2230	24	-
Ago/05	A2	L51P38	+	-	-	-	+	+	<i>L. ivanovii</i> – NR *	hemolítica	2230	-	-
Ago/05	A2	L51P39	+	-	-	-	+	+	<i>L. ivanovii</i> *	hemolítica	2230	24	-

* Isolados identificados através do api® Listeria.

NC – Isolados não recuperados.

9. VITA

Nome completo: Sylvia Elisa Frizzo Verdin

Data e local de nascimento: 28/09/1978, Belém/PA

Filiação: Ana Maria Lima Frizzo e Sérgio João Frizzo

Formação:

1999 – 2004: Ensino Superior: Graduação em Engenharia de Alimentos – UFC, Fortaleza/CE.

1986 – 1996: Ensinos Fundamental e Médio: Colégio Santa Cecília – Fortaleza/CE.

Atividades Profissionais:

2001 – 2003: estágio no Laboratório de Frutos Tropicais do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFC, sob a orientação do Prof. Dr. Geraldo Arraes Maia. Vínculo: bolsista CNPq. Atividades de iniciação científica ligadas a projetos de mestrado.

2000 – 2003: estágio no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFC, sob a orientação da Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo. Vínculo: estágio voluntário. Atividades de iniciação científica ligadas a projetos de mestrado e extensão universitária.