



UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIAGNÓSTICO
GENÉTICO E MOLECULAR

**DETECÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM PRODUTOS ALIMENTARES
À BASE DE FRANGO NATURALMENTE CONTAMINADOS: COMPARAÇÃO
ENTRE DOIS MÉTODOS COMERCIAIS BASEADOS NA PCR EM TEMPO REAL,
NEWGENE™ E BAX™ SYSTEM, E O MÉTODO DE CULTIVO CONVENCIONAL**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Diagnóstico Genético e Molecular da
Universidade Luterana do Brasil, para
obtenção do Título de Mestre em
Diagnóstico Genético e Molecular.

THAÍS DA ROCHA BOEIRA

Orientador: Dr. NILO IKUTA

CANOAS

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AGRADECIMENTOS

Algumas pessoas marcam nossas vidas para sempre, umas porque nos apresentam projetos de sonhos e outras ainda porque nos desafiam a construí-los.

Dedico este trabalho, à “grandes pessoas”; àquelas que fizeram nascer dentro de mim, um “grande sentimento”, e que muito contribuíram na conquista do meu objetivo!

Em primeiro lugar quero agradecer **aos meus pais**, pelas angústias e preocupações que passaram por minha causa, por terem dedicado suas vidas a mim, pelo amor, carinho e estímulo que me ofereceram, essenciais em todas as etapas da minha vida; e a **minha irmã** pela paciência e amor!

Um agradecimento especial a você **Clerisson**. Um homem de garra, sensacional, que esta sempre ao meu lado me apoiando, que merece todo meu respeito, paixão, amor.... Você merece tudo isso o que eu estou fazendo e muito mais!!!! Eu te Amo MUITOOOO!!!!

À memória de meu avô, **Tatáio**, que mesmo sem saber, me auxilia em todos os meus momentos, de alegria e tristeza, por estar com muito amor, dentro do meu coração.

À toda minha família, e aos meus **amigos**, que sempre me incentivaram e compreenderam minha ausência, enquanto realizava esta aventura.

Ao Nilo Ikuta, meu orientador e professor modelo. Agradeço a ajuda prestimosa, a paciência e carinho com que sempre me acolheu, mas principalmente pela compreensão e amizade... Por sua *culpa*, vislumbrei um ideal nesta profissão, e sobretudo agradeço por ter me desafiado!

Agradeço à **Simbios** pela oportunidade de realizar este trabalho, e a meus **colegas de trabalho** pelo apoio, amizade e estímulo.

Em fim, agradeço **a todos** que fizeram, e fazem, parte da minha história; que amo mais do que a minha própria VIDA!

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Diagnóstico Molecular da Universidade Luterana do Brasil e financiado pela FINEP (convênio nº 01.02.0132.00).

ÍNDICE

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
CAPÍTULO I	
1. INTRODUÇÃO	6
1.1 Classificação.....	8
1.2 Métodos para detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	9
1.2.1 Métodos microbiológicos	9
1.2.2 Métodos imunológicos.....	10
1.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	11
1.2.4 PCR em tempo real	11
2. OBJETIVO GERAL.....	14
CAPÍTULO II	
Comparison of two Real Time PCR kits, NewGene™ and BAX™, and the culture based method for detection of <i>Listeria monocytogenes</i> in naturally contaminated poultry products	15
CAPÍTULO III	
PERSPECTIVAS E CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

RESUMO

Este trabalho apresenta um estudo comparativo entre dois métodos comerciais baseados na PCR em tempo real (BAX™ system e NewGene™) e o ensaio microbiológico convencional para detecção de *Listeria monocytogenes* em amostras de alimento naturalmente contaminadas derivadas de produtos à base de frango. Noventa e oito produtos alimentares à base de frango foram processados neste estudo, e os métodos baseados na PCR em tempo real foram executados a partir de alíquotas do mesmo caldo de enriquecimento usado no procedimento microbiológico. Dez amostras apresentaram resultados positivos e 76 apresentaram resultados negativos em todos os métodos. Dentre as restantes 12 amostras discordantes, o kit NewGene™ detectou DNA de *Listeria monocytogenes* em todas estas amostras, sendo 4 em concordância com o procedimento de cultivo convencional, 6 em concordância com o kit BAX™ system e 2 amostras apresentaram-se positivas somente nas avaliações com o kit NewGene™. Entretanto, estes resultados discordantes não representaram diferenças estatisticamente significativas. Considerando o método microbiológico como "padrão ouro", a sensibilidade dos kits BAX™ system e Newgene™ avaliados foi de 71,4 % e 100% respectivamente; e a especificidade, foi de 92,9% e 90,5%.

ABSTRACT

A comparative study among two commercial Real Time PCR based methods (BAX™ system and NewGene™) and the conventional microbiological assay to detection *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated food samples derived from poultry products was made. Ninety-eight poultry products were processed in this survey, and Real Time PCR methods were performed from aliquots of the same enrichment broth used in microbiological procedure. Ten samples were positive and 76 were negative by all methods. In all the remaining 12 discordant samples, NewGene™ procedure detected *Listeria monocytogenes* DNA, being 4 in concordance with culture procedure, 6 in concordance with BAX™ and 2 only positive by NewGene™. However, these results did not represent statistically significant differences. Considering culture method as “gold standard”, the sensitivity of the BAX™ and Newgene™ were evaluated in 71.4% and 100% respectively, and the specificity, were 92.9% and 90.5%.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A Conferência Internacional em Nutrição da FAO/OMS (Organização Mundial de Saúde), ocorrida em 1992, preparou um documento reconhecendo que o acesso ao alimento nutricionalmente adequado e seguro é um direito de **todo o indivíduo**, apontando que centenas de milhares de pessoas sofrem de enfermidades causadas por Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) (WHO, 1996).

As DTAs emergiram como um crescente problema econômico e de saúde pública em muitos países durante as últimas duas décadas. Países como os EUA e Inglaterra reportaram aumentos significativos na incidência (número dos casos) de DTAs neste período (Rocourt *et al.*, 2003). Nos EUA, estima-se que anualmente as doenças transmitidas por alimentos causam aproximadamente 76 milhões de casos de doenças, 325.000 hospitalizações e 5.000 mortes; e na Inglaterra 2.400.000 casos de doença, 21.000 hospitalizações e 700 mortes (Mead *et al.*, 1999; Adak *et al.*, 2002).

As contaminações químicas e biológicas durante a produção, processamento e consumo em decorrência das práticas inadequadas aumentam substancialmente o risco de ocorrência de DTAs (Käferstein & Abdussalam, 1999). Hábitos como a má higienização das mãos antes do preparo dos alimentos, cozimento inadequado, armazenamento sob temperaturas incorretas e a aquisição de produtos de origem desconhecida ou duvidosa (produtos sem identificação, data de fabricação e validade) são algumas das situações mais freqüentes que colocam o alimento e a saúde do consumidor em risco (Germano & Germano, 2001).

Mais de 200 doenças transmitidas pelos alimentos são conhecidas. As causas incluem vírus, bactérias, protozoários, fungos, parasitas, toxinas, metais e príons (Mead *et al.*, 1999). Entre o período de 1998 a 2002, o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) reportou um total de 6.647 surtos de DTAs nos Estados Unidos, envolvendo 128.370 pessoas. Entre 2.167 (33%) dos surtos os quais tiveram sua etiologia determinada, as bactérias foram causadoras da maior porcentagem destes (55%). Entre os patógenos bacterianos, *Salmonella* causou o maior número

dos surtos e *Listeria monocytogenes* causou a maioria das mortes. Entre os demais patógenos identificados como causas dos surtos estavam vírus, agentes químicos e parasitas, com 33%, 10% e 1% dos casos respectivamente (CDC, 2006).

A *Listeria* encontra-se amplamente distribuída na natureza, fato que explica a facilidade com que é encontrada em alimentos, desde a produção até o consumo (Beuchat, 1996). A *Listeria monocytogenes* é reportada como um importante patógeno em humanos e animais (Unnerstad *et al.*, 1999; Liu, 2006). Embora esta espécie tenha sido descrita como causa da listeriose há mais de 50 anos, o reconhecimento desta doença como um importante problema de saúde pública deu-se a partir das documentações de surtos por contaminação alimentar na década de 80 (Niederhauser *et al.*, 1992). A listeriose é rara e grave, pois apresenta alta taxa de mortalidade (20–30%) comparada a outros microorganismos causadores de doenças alimentares (FAO/WHO, 2004). Nos Estados Unidos, foram reportados 466 casos de listeriose durante doze surtos entre 1970 a 2002.

Atualmente, sabe-se da existência de dois “tipos” de listeriose humana. O primeiro está relacionado à forma mais grave da doença e que compromete principalmente o sistema nervoso central, manifestando-se através da meningite, encefalite, septicemia e abscessos, ou provocando aborto no 2º ou 3º trimestre e nascimento de feto prematuro. Endocardites e osteomielites também podem ocorrer, mas são raras. O período de incubação da listeriose pode variar de um dia a algumas semanas (Slutsker & Schuchat, 1999). O segundo tipo, mais brando, é uma doença gastro intestinal auto limitada e não invasiva, caracterizada pelo desenvolvimento de febre, diarreia, náusea, vômito, dor de cabeça e mialgia, após 12 a 24 horas de exposição (Salamina *et al.*, 1996).

A pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo é de grande importância, pois se sabe que os alimentos envolvidos em surtos e casos esporádicos de listeriose são aqueles processados industrialmente, mantidos sob refrigeração, com vida de prateleira longa (Swaminathan, 2001). Dentre os alimentos já envolvidos nos surtos de listeriose, estão: leites crus e pasteurizados, queijos, carnes bovina, suína, de aves e seus derivados, frutos do mar, além de produtos de origem vegetal, crus ou processados, e refeições preparadas (Franco & Landgraf, 1996; Ryser & Donnelly, 2001). A ingestão de alimentos contaminados pelo microrganismo é particularmente perigosa para gestantes, indivíduos portadores de HIV, cirrose, carcinoma e outras doenças que provocam comprometimento do

sistema imunológico (Slutsker & Schuchat, 1999). Além disso, a doença pode ocorrer ocasionalmente em indivíduos não pertencentes aos grupos de maior suscetibilidade (Ryser & Donnelly, 2001). Idosos e recém-nascidos também são suscetíveis e enquadrados como indivíduos de alto risco (FDA, 2003).

Por precaução, regulamentações de segurança alimentar têm procurado a adoção de uma atitude de “tolerância zero” para a presença de *L. monocytogenes* em produtos prontos para o consumo (Gallagher *et al.*, 2003). Entretanto, como os casos clínicos de listeriose são freqüentemente associados com concentrações elevadas (Farber & Peterkin, 1991) e a *Listeria* é de difícil erradicação do meio ambiente e das plantas industriais (Gravani, 1999), a Comissão Internacional de Especificação Microbiológica para alimentos concluiu que 100 unidades formadoras de colônias (ufc) por grama de alimento no momento do consumo são aceitáveis para consumidores fora do grupo de risco (Jay, 1996; Phillips, 1998).

1.1 Classificação

Listeria monocytogenes é uma bactéria ubíqua, com capacidade de se desenvolver em condições inóspitas para outros microrganismos patogênicos. É capaz de se multiplicar em temperaturas que variam de 0 a 45°C, tendo temperatura ótima de crescimento entre 30 e 37°C (Murray *et al.*, 1999; Swaminathan, 2001).

Segundo o Manual de Bergey (Hensyl, 1994), *Listeria* apresenta uma proporção de guanina e citosina no seu DNA entre 36 – 38%, é um bacilo pequeno (0,4 a 0,5 µm de diâmetro e 0,5 - 2 µm de comprimento), regular, Gram-positivo, que pode se apresentar em unidades ou em pequenas cadeias. Não forma esporos, produz catalase, mas não oxidase. É móvel a 28°C, com movimento característico de tombamento, e é imóvel a 35°C. É anaeróbico facultativo (Hensyl, 1994; Murray *et al.*, 1999). A multiplicação ocorre rapidamente na maioria dos meios bacteriológicos utilizados na rotina laboratorial (Ryser & Donnelly, 2001).

O pH de multiplicação de *L. monocytogenes* varia entre 4,4 e 9,6; mas se multiplica melhor entre 6,0 e 8,0 (Rocourt, 1999). Por ser ácido tolerante, pode sobreviver em alimentos de baixo pH por semanas (Ryser & Donnelly, 2001). *Listeria* é um dos poucos microrganismos patogênicos que pode se multiplicar em substratos com baixa concentração de água e em meio de cultura com 10% de NaCl (Farber *et al.*, 1992; Rocourt, 1999).

O gênero *Listeria* compreende as seguintes espécies: *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, (consideradas não-patogênicas em humanos) e *L. monocytogenes* (patogênica em humanos e a mais importante espécie nos casos de infecções transmitidas pelos alimentos) (Murray *et al.*, 1999; Rocourt, 1999). A hemolisina é o fator mais importante de virulência da *Listeria*, sendo três espécies hemolíticas: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* (Gouin *et al.*, 1994; Murray *et al.*, 1999).

A *L. monocytogenes* é classificada em sorotipos com base em antígenos somáticos (O) e flagelar (H) (Murray *et al.*, 1999). São conhecidos 13 sorotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7), mas somente três (4b, 1/2a e 1/2b) são responsáveis por 89 a 96% dos casos de listeriose humana (ICMSF, 1996; Tompkim, 2002), com predomínio do sorotipo 4b nos casos de doença (Zheng & Kathariou, 1995). Esse sorotipo (4b) é responsável por 33 a 50% de casos esporádicos em humanos (Swaminathan, 2001).

1.2 Métodos para detecção de *Listeria monocytogenes*

1.2.1 Métodos microbiológicos

Vários protocolos baseados no cultivo microbiológico de *Listeria monocytogenes* são comumente utilizados no mundo, dentro os quais: International Organization for Standardization (ISO, 1996), *United State of Department of Agriculture – Food Safety and Inspection Service* (USDA – FISIS) (Johnson, 1998); *Bacteriological Analytical Manual (BAM) – Food and Drug Administration (FDA)* (Hitchins, 1998) e AOAC Internacional (AOAC, 1999).

Uma etapa inicial de enriquecimento é quase sempre usada para facilitar a recuperação de organismos injuriados que podem ser encontrados em amostras de alimentos processados. Além disto, ela pode promover a multiplicação seletiva do organismo alvo. Esforços para reduzir o tempo de recuperação e o isolamento de *Listeria spp.* em matrizes complexas e amostras ambientais resultaram no desenvolvimento de diferentes caldos de enriquecimento e meios sólidos seletivos e diferenciais (Donnelly, 1999).

Os protocolos de dois métodos, o do FDA (*Food and Drug Administration*) e o do USDA – FSIS (Johnson, 1998), são mais comumente usados nos Estados Unidos

para pesquisa de *L. monocytogenes*. Muitos relatos encontrados comparam estes métodos, demonstrando que cada um possui vantagens e desvantagens quando aplicados para isolamento deste patógeno em função dos diferentes tipos de alimento (Donnelly, 1999). O método do FDA é mais sensível e eficiente para isolamento de *L. monocytogenes* em alimentos com baixa concentração da flora microbiana acompanhante. Já o método USDA-FSIS, que usa duas etapas de enriquecimento, possui maior sensibilidade para as amostras com elevada microbiota acompanhante (Patel & Beuchat, 1995; Jiang, *et al.*, 1998).

Entre as limitações dos métodos microbiológicos está o tempo necessário para obtenção de resultados. Os resultados negativos podem ser obtidos no mínimo em 4 dias e a identificação de *L. monocytogenes* pode levar até 9 dias a partir do isolamento da colônia (Hitchins, 1998). Além disso, estes métodos são susceptíveis a ocorrência de resultados falso-negativos decorrentes: i) da presença de células inviáveis para cultivo nos meios empregados (devido a células injuriadas ou estressadas), ou ii) dos casos de multiplicação preferencial de outras espécies, sobrepondo a população de *L. monocytogenes*. (Petran & Swanson, 1993; Donnelly, 1999).

1.2.2 Métodos imunológicos

Os ensaios imunológicos têm sido bastante difundidos na detecção de *Listeria monocytogenes*. Os sistemas de detecção utilizados são os testes imunoenzimáticos, de aglutinação de partículas, de imunoprecipitação, imunocoloração direta, esferas paramagnéticas cobertas com anticorpos e biosensores baseados em anticorpos (Robinson, 1997).

Os testes imunoenzimáticos são largamente empregados visto terem diversas vantagens: simplicidade, sensibilidade, especificidade e conveniência como método de triagem. Foram desenvolvidos testes de ELISA para a identificação rápida de *Listeria* em alimentos (Sewell *et al.*, 2003), utilizando anticorpos monoclonais (Yu *et al.*, 2004; Hearty *et al.*, 2006, Tully *et al.*, 2006) e algumas variações como o ELISA tipo “sanduíche” (Kim *et al.*, 2005). Esses testes têm acelerado significativamente a identificação de amostras positivas para *Listeria* (Ryser & Donnelly, 2001). Já existem vários ensaios disponíveis comercialmente, dentre os quais o *Listeria* Visual Immunoassay (LisVIA) (Hughes *et al.*, 2003), produzido pela Tecra™ Diagnostics

(Austrália) e o Visual Immunoprecipitate Assay (VIP™), da BioControl Systems (EUA), sendo o tempo total para obtenção de resultados, respectivamente, 50 e 52 horas. Porém, é importante ressaltar que, tanto no teste LisVIA como no VIP™, os resultados positivos são presuntivos, ou seja, deverão ser confirmados pelos métodos tradicionais; já os resultados negativos são confirmatórios. Artigos para avaliação comparativa destes testes comerciais foram publicados (Gangar *et al.*, 2000; Silberniagel *et al.*, 2004; Silberniagel *et al.*, 2005).

1.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Poucos métodos têm revolucionado tantos campos quanto a PCR, levando ao desenvolvimento de inúmeros testes para detecção de *L. monocytogenes* (Bessesen *et al.*, 1990; Border *et al.*, 1990; Deneer & Boychuk, 1991; Siggens, 1995; Mikasova *et al.*, 2005). Muitos destes testes foram desenvolvidos para detecção específica em amostras de alimentos (Niederhauser *et al.*, 1992; Makino *et al.*, 1995; Bansal, 1996; O'Connor *et al.*, 2000; Aznar & Alarcon, 2002; Cocolin *et al.*, 2002; Somer & Kashi, 2003;).

Devido à necessidade de testes rápidos e sensíveis para detecção de patógenos alimentares, um projeto de pesquisa europeu, denominado FOOD-PCR, foi criado para validação e padronização de métodos alternativos ao cultivo convencional, baseados na PCR, com formulações disponíveis e não-comerciais. Dentre outros métodos já validados pelo grupo a partir de estudos colaborativos, D'Agostino *et al.* (2004) descrevem a validação de um teste para detecção específica de *L. monocytogenes* baseada na PCR, com o objetivo de uma eventual inclusão dentre os padrões internacionais.

1.2.4 PCR em tempo real

Uma segunda geração de diagnóstico molecular para detecção e/ou quantificação de *Listeria monocytogenes* em alimentos está em desenvolvimento crescente. A técnica denominada PCR em Tempo Real combina os processos de amplificação e detecção num mesmo equipamento, sem a necessidade de processos adicionais para a detecção dos produtos de amplificação. Isto reduz o tempo para obtenção dos resultados, diminui a possibilidade de contaminação (não se manipula o

produto amplificado) e permite a automatização do processo. Para a leitura em tempo real, utilizam-se agentes fluorescentes para detecção dos produtos de amplificação, que podem estar livres ou ligadas a sondas ou primers. Entre os agentes mais utilizados encontram-se respectivamente o SYBRTM Green I e a Taqman[®].

O SYBRTM Green I é um agente fluorescente com afinidade ao DNA fita dupla. Num processo de amplificação, há maior emissão de luz à medida que há um incremento na concentração de DNA a cada ciclo da PCR. A partir de utilização de um único par de oligonucleotídeos, é possível diferenciar resultados positivos das eventuais amplificações inespecíficas, através da análise da temperatura de dissociação (“Melting temperature” ou T_m). Navas *et al.* (2006) descrevem a eficiência do teste para detecção específica de *L. monocytogenes* a partir de enriquecimento primário e secundário de carnes de frangos, utilizando como alvo o gene *inl A*. Este trabalho comparou os resultados com o cultivo convencional, e demonstrou a importância da utilização prévia de etapas de enriquecimento para evitar falsos positivos e negativos na realização do teste molecular. Já existem métodos comerciais disponíveis, baseados em Sybergreen I como o BAXTM System. Este kit é produzido pela DuPont (divisão Qualicon) e tem sido adotado pela USDA-FISIS e certificado pela AOAC como método oficial. O sistema de detecção de patógenos BAXTM é um método de análise que pode ser empregado tanto para amostras de alimentos como para amostras ambientais (User’s Guide, 2000). O processo de amplificação leva cerca de três horas e meia para ser completado. O protocolo para pesquisa de *L. monocytogenes* recomendado pelo fabricante em amostras de alimentos inclui as seguintes etapas: enriquecimento primário, enriquecimento secundário, lise celular, amplificação do DNA e leitura dos resultados.

O sistema TaqmanTM PCR utiliza uma sonda ligada a uma molécula fluorescente. A emissão de luz ocorre somente quando o agente fluorescente é separado da sonda pela atividade de exonuclease 5’ – 3’ da *Taq* DNA polimerase. Esta atividade enzimática só ocorre quando a sonda está em forma de fita dupla ligada ao seu alvo (Heid *et al.*, 1996). Dentre as metodologias já descritas baseadas neste sistema de detecção em tempo real, destaca-se o método descrito por Rodríguez-Lázaro *et al.* (2004a), por sua ampla avaliação de especificidade (100% específico a partir da avaliação de 100 cepas de *Listeria* e 45 cepas de não *Listeria*), alta sensibilidade e possibilidade de quantificação. Em um trabalho subsequente, Rodríguez-Lázaro *et al.*

(2004b) aplicou a técnica desenvolvida em produtos cárneos (presunto cozido) artificialmente contaminados com diluições seriadas de *L. monocytogenes*, e comparou os resultados obtidos com a metodologia microbiológica convencional, obtendo 100% de acurácia relativa. A metodologia molecular baseada na Taqman™ PCR descrita por Rodríguez-Lázaro *et al.* (2004a) está atualmente disponível na forma de kit comercial, NewGene™, o qual é produzido por uma empresa nacional (Simbios Biotecnologia).

2. OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo avaliar comparativamente as metodologias baseadas na PCR em tempo real (NewGene™ e BAX™ system) com o cultivo microbiológico convencional para detecção de *Listeria monocytogenes* a partir de produtos alimentares à base de frango naturalmente contaminados.

CAPÍTULO II

Comparison of two Real Time PCR kits, NewGene™ and BAX™, and the culture based method for detection of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated poultry products

ABSTRACT

A comparative study among two commercial Real Time PCR based methods (BAX™ system and NewGene™) and the conventional microbiological assay to detection *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated food samples derived from poultry products was made. Ninety-eight poultry products were processed in this survey, and Real Time PCR methods were performed from aliquots of the same enrichment broth used in microbiological procedure. Ten samples were positive and 76 were negative by all methods. In all the remaining 12 discordant samples, NewGene™ procedure detected *Listeria monocytogenes* DNA, being 4 in concordance with culture procedure, 6 in concordance with BAX™ and 2 only positive by NewGene™. However, these results did not represent statistically significant differences. Considering culture method as “gold standard”, the sensitivity of the BAX™ and Newgene™ were evaluated in 71.4% and 100% respectively, and the specificity, were 92.9% and 90.5%.

Key words: *Listeria monocytogenes*, NewGene™, BAX™ system, culture and real time PCR

INTRODUCTION

The genus *Listeria* comprises the following characterized species: *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, and *L. monocytogenes* (Murray *et al.*, 1999). Among these gram-positive, nonsporulating and motile species, only *L. monocytogenes* is capable of causing severe infections, especially in immunocompromised individuals, the elderly, newborns, and pregnant women (Schuchat *et al.*, 1991). *L. monocytogenes* belongs to the facultative intracellular bacteria that invades, replicates, and multiplies in a variety of mammalian cells (Kuhn & Goebel, 1995). This bacterium is widely distributed in the environment (Kathariou, 1999; Vazquez-Boland, *et al.*, 2001; Kathariou, 2002).

Clinical cases are usually associated with high loads of *L. monocytogenes* (Dalton *et al.*, 1997; Farber & Peterkin, 1991). During the early stages of infection, human listeriosis often displays non-specific flu-like symptoms (e.g. chills, fatigue, headache, and muscular and joint pain) and gastroenteritis. However, without appropriate antibiotic treatment, it can develop into septicemia, meningitis, encephalitis, abortion and, in some cases, death (Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Indeed, with mortality rates on average approaching 30%, *L. monocytogenes* far exceeds other common foodborne pathogens in terms of disease severity such as *Salmonella* (with a mortality of 0.38 %), *Campylobacter* (0.02–0.1%) and *Vibrio* (0.005–0.01 %) (Altekruse *et al.*, 1997; Mead *et al.*, 1999).

Meat products are a major source of *L. monocytogenes* (CDC, 2000; Peccio *et al.*, 2003; Samelis & Metaxopoulos, 1999; Schlech *et al.*, 1983), and this bacterium is able to grow at refrigerated temperatures commonly used to preserve ready-to-eat foods (Hudson & Mott, 1993). Food safety regulations have tended to adopt a zero-tolerance attitude for infected *L. monocytogenes* products (Gallagher *et al.*, 2003). The International Commission on Microbiological Specification for Foods concluded that 100 colony forming unity (cfu) of *L. monocytogenes* per g of food is acceptable for consumers not in risk groups (Phillips, 1998). A prerequisite for the general adoption of this criterion is the availability of appropriate laboratory methods for the differentiation of *L. monocytogenes* and *L. innocua* and for the specific and precise quantification of *L. monocytogenes* in food.

Despite considerable advances in newer diagnostic methods, conventional bacteriology remains the foundation of *L. monocytogenes* detection protocols. Current conventional detection method involves pre-enrichment, selective enrichment, plating on selective agar, and subsequent biochemical species differentiating tests to distinguish *L. monocytogenes* from other member of the *Listeria* genus (Curtis & Lee, 1995; O'Connor *et al.*, 2000).

The PCR-based methods have become a powerful tool in microbiological diagnostics. Particularly, Real Time PCR permits high throughput and automation (Klein, 2002). Many types of Real Time PCR chemistries were developed based on SYBR[™] Green I and TaqMan[™]. The SYBR[™] Green I dye chemistry uses a fluorescent double-stranded DNA binding dye to detect PCR product as it accumulates during PCR cycles. This method has been used to detect (Nguyen *et al.*, 2004; Rudi *et al.*, 2005; Junge & Berghof-Jager, 2006) and quantify *Listeria monocytogenes* (Nogva *et al.*, 2000; Hough *et al.*, 2002; Berrada *et al.*, 2006). Nowadays, the commercial BAX[™] Automated system is approved by AOAC to detect *Listeria monocytogenes* in food samples after sample enrichment.

The TaqMan[™], also known as “fluorogenic 5′ nuclease chemistry”, uses the exonuclease activity of Taq DNA polymerase to discharge probe fluorescence during PCR cycles. Nguyen *et al.* (2004) described a multiplex detection of *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* in artificially contaminated foods, demonstrating a specific, sensitive and rapid assay. The TaqMan[™] technology had been described also for quantitative purposes. Rodríguez-Lázaro *et al.* (2004a) described a Real Time PCR (qPCR) for *Listeria monocytogenes* quantification that showed to be specific and highly sensitive. The new commercial kit NewGene[™], supplied by Simbios Biotecnologia is an alternative test based on Rodríguez-Lázaro procedure. The purpose of the present study was to evaluate the efficiency of NewGene[™] in comparison with two validated methodologies, the BAX[™] system and the traditional culture procedure for detection of *L. monocytogenes* in 98 naturally contaminated poultry product samples.

MATERIAL AND METHODS

Microbial culture procedures

The microbiol culture procedure was performed according to ISO 11290-1. The culture media and other reagents used were prepared according to the instructions of the manufacturer. Briefly, the first selective enrichment was carried out by adding 25 g of analytical portions of food samples into Whril-Pak bag containing 225 mL of UVM broth. The bags were homogenized for 1 min in a Stomacher and incubated at 30°C for 24 h. From the second selective enrichment culture, 0.1 mL of UVM broth was transferred onto 10 mL of Fraser broth. Samples were incubated at 35°C for 24-48h. Samples from UVM broth and/or Fraser broth were inoculated on PALCAM and ALOA agars and incubated at 35°C for 24-48 hours for isolation procedure. Typical colonies from PALCAM and ALOA were re-isolated in ATN agar at 30°C for 24 hours. Purified isolates were identified by the following classical tests: test typical colonies for catalase; motility test medium; TSAYE agar; CAMP test; VM-VP broth; nitrate reduction test; carbohydrates fermentation and serological tests.

Molecular procedures

The BAX™ system protocol (Qualicon, Inc., Wilmington, Del.) was performed according to the manufacture's directions. Briefly, 5µL of enriched samples (aliquots from first selective enrichment of conventional culture) were added to tubes containing 200µL of protease solution and incubated at 55°C to 1 hour, followed by 95°C for 10 minutes. After that, these mixtures were incubated at 2-8°C and 50 µL were added to PCR reaction tubes, and thermalcycled in equipment supplied by DuPont.

The NewGene™ (SIMBIOS Biotecnologia, Canoas, RS, Brazil) was performed according to manufacture's directions. The procedure consists of DNA extraction step using NewGene™ Prep and NewGene™ Preamp kits and amplification using NewGene™ LMOAmp Real Time PCR kit. The NewGene™ Prep and NewGene™ Preamp kits are based on the method described by Boom *et al.* (1990). Briefly, 100 µL of enriched samples were added to 400 µL of lysis buffer and then incubated at 60°C for 10 min. After centrifugation (10,000 x *g*, 1 min), the supernatant was transferred to a tube containing 20 µL of silica suspension. After vortex and centrifugation (10,000 x *g*, 1 min), the pellet was washed twice with 150 µL GuSCN-Tris buffer, twice with 75% ethanol and once with absolute ethanol. The silica suspension was dried and DNA was eluted with 50 µL of elution buffer and 2.0 µL was used as template in PCR reaction. The NewGene™ LMOAmp Real Time PCR kit is based on the procedure

described by Rodríguez-Lázaro *et al.* (2004a), with the probe labeled with the fluorescent dye 6-carboxyfluorescein (FAM; reporter dye) on the 5' end and MGB and the quencher dye on the 3' end. The Real Time PCR analysis was performed using a PE Applied Biosystems 7000 Sequence Detector System with the following program: 3 min at 95 °C, and 45 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. PCR amplifications were carried out in 1X PCR buffer with 5-carboxy-Xrhodamine [ROX] as passive reference dye.

Naturally contaminated samples

A total of 98 samples including foods derived from poultry were investigated for presence of *L. monocytogenes* using traditional culture method and also Real Time PCR (BAX™ system and NewGene™). The samples used in this study were derived from analysis of quality control of a producing food company in the south of Brazil, where detection of *L. monocytogenes* in poultry products was carried out according to the ISO 11290-1.

Sensitivity and quantification range of the NewGene™

Once sensitivity and quantification range were not informed by the manufacturer of the NewGene™ kit, these parameters were evaluated using a range of bacterial genomic DNA concentrations determined by luminescence spectrometer. Amplification reactions were performed in a total of ten replicates in four independent experiments with a range of DNA concentrations equivalent to approximately 1×10^5 , 2×10^4 , 4×10^3 , 8×10^2 , 161, 32, 6 and 1 target molecules per reaction.

Statistical analysis

The proportion of positive vs. negative samples among the distinctive methods was compared using chi-square (X^2) test. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Standard procedures were used to calculate sensitivity and specificity for each method. Accuracy was calculated too, as the sum of positive-positive and negative-negative results expressed as a percentage. Finally, Kappa index was

determined indicating the strength of the relationship between variables of a cross tabulation (with values > 0.7 indicating inter-rater reliability as satisfactory).

RESULTS

Analysis of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated samples

A total of 98 potentially naturally contaminated samples were analyzed by traditional culture method, NewGene™ and BAX™ system. The molecular methods were performed from the same first selective pre-enrichment tube (after 24 h of incubation). Seventy-six samples showed negative results by all 3 methods, and *L. monocytogenes* were detected in 22 samples for at least one of them.

In a total of 98 samples, 14 were positive by culture method, 16 were positive by BAX™ system and 22 by NewGene™ kit (Table 1). All the 14 positive samples by culture method showed positive results confirmed by NewGene™, but only 10 of these were positive by BAX™. Of the eight positive remaining samples detected by NewGene™ and negative by culture method, six were positive by BAX™ system method. Results between all methods, did not demonstrated significant differences ($P < 0.05$).

Relative diagnostic accuracy, sensitivity, specificity and kappa index of the molecular techniques were evaluated considering cultural results as gold standard (Table 2). The diagnostic accuracy and specificity of BAX™ system and NewGene™ showed values around 90%. The sensibility was calculated for NewGene™ in 100% and for BAX™ in 71.4%, and kappa index 0.731 and 0.607 respectively.

All *L. monocytogenes* positive samples (22) were quantified by NewGene™ and compared with detection results of culture and BAX procedure (Table 3). Ninety one percent (20 samples) of positive results were obtained at least with agreement of 2 methods, being 45.5% (10 samples) of these in complete agreement. Analyzing discordant results, 4 samples (related with concentrations lower than 2,700 genomes Equivalent/mL) could not be detected by BAX™ system, and 2 remaining samples (300 and 550 genomes Equivalent/mL) could not be detected by culture and BAX™

system. Six samples with high concentrations (186,000 to 850,000 genomes Equivalent/mL) could be detected by BAX™ but not isolated by microbial procedure.

Twelve samples (54.5%) presented more than 8,000 genome Equivalent/ mL, 5 samples (22.7%) between 1,600 – 8,000 and the remaining 5 samples (22.7%) presented concentration between 300 – 1,600 genomes Equivalent/ mL. *L. monocytogenes* were detected by BAX™ system in 16 samples and culture in 14 samples.

Sensitivity and quantification range of the NewGene™

The determination of sensitivity and repeatability of NewGene™ was determined by serial dilution of previously quantified *Listeria monocytogenes* genomic DNA. Genomic concentrations between 1 and 10,000 target molecules were amplified in 4 distinct days with 2-3 replicates each one.

Figure 1 illustrates the amplification profiles and the regression curves obtained with this Real Time PCR and Table 4 shows the mean CT values for a total of ten replicates. Positive amplifications were observed in 100%, 80% and 30% of cases with respectively more than 8,000, 1,600 and 300 *Listeria* genomes Equivalent/mL (or 32, 6 and 1 genomes Equivalent per reaction).

DISCUSSION

Listeria monocytogenes is often found in various uncooked foods, such as meat, cheese, and vegetables and widely diffused in the environment. Thus, food industry needs rapid screening methods to control contamination of food products.

The advances in biotechnology over the past decades have resulted in the development of many methods for the detection of pathogenic microorganisms. Several PCR protocols have been proposed to replace the time-consuming microbiological techniques (Rossen *et al.*, 1991; Norton & Batt, 1999; Nogva *et al.*, 2000; Aznar & Alarcón, 2003; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2004a; Guilbaud *et al.*, 2005). Recent descriptions of commercial kits for *L. monocytogenes* detection based on Real Time PCR have been published. The BAX™ system is a well-studied procedure, with

evaluation of sensitivity and specificity performed by Hochberg *et al.* (2001) and Stewart & Gendel (1998), and demonstrations of no significant differences with culture-based detection in analysis of raw ingredients and the processing environmental samples (Hoffman & Wiedmann, 2001). Junge & Bergrof-Jager (2006) described another Real Time PCR kit denominated Roche BIOTECON Diagnostics LightCycler that showed equal or better results than the reference cultural FDA/BAM or USDA/FSIS. The present study compared the efficiency of Real Time PCR kits and the culture procedure to detect *L. monocytogenes* in naturally contaminated food.

For all methods compared, analyses of naturally contaminated poultry product samples were performed based on a common pre-enriched culture tube used in the microbiologic assay. The diagnostic accuracy and specificity of BAXTM system and NewGeneTM showed to be similar (close 90%). The kappa indexes of both methods indicated strong agree and the sensitivity of NewGeneTM was 100% and BAXTM 71.4% (Table 2). There were no statistically significant differences among NewGeneTM, BAXTM and cultural procedure results.

The NewGeneTM was characterized in this study evaluating aspects about repeatability, sensitivity and range of analysis. The Figure 1 shows that slopes of the linear regression curves calculated over a 5-log range was -3.19 ; similar to the theoretical optimum of -3.32 (Higuchi *et al.* 1993, apud Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2004b). Moreover, R^2 values were always above 0.98 demonstrating that NewGeneTM qPCR system was highly linear, and potentially can be used to detect and quantify accurately the *L. monocytogenes* populations.

Table 4 presents repeatability and sensitivity, and absolute detection values results converged with the demonstrated by Rodríguez-Lázaro *et al.* (2004a). Samples contained at least 8.000 genomes Equivalent/mL were related with CT's values lower than 34.5 with very low standard deviation (<0.5 in 10 repetitions). Probability of positive results reduced to 80%, in cases around 1,600 genome Equivalent per mL, and to 30% in cases lower than 300 genomes Equivalent per mL. In these last 2 cases, CT's values were higher than 38 and standard deviation were enlarged.

Quantitative data from NewGene were also analyzed to better understand the results obtained in our study (Table 3). From total of positive cases (22 samples), 45.5% were detected by all methods (bacterial load between 4,000 to 690,000

genome Equivalent per mL), almost of them with high bacterial concentrations (average 190,835). The discordant results were related with two situations, samples with low bacterial concentration (< 2,700 genome Equivalent/mL) and high concentration (10^6 genome Equivalent per mL). In the first case, 9.1% were detected only by NewGene™ (< 500 genome Equivalent/mL), and 18.2% detected by both NewGene™ and culture methods (< 2,700 genome Equivalent/mL). All results from second situation corresponded to positive results in both Real Time PCR kits with no *L. monocytogenes* isolations in culture procedure.

Results of low bacterial concentration indicate that differences in detection capacity were related to the higher sensitivity of the NewGene™ qPCR. On the one hand, this high sensitivity allows fast detection of *L. monocytogenes* in contaminated food and can be strategically maintained. On the other, with focus in a best convergence with other methodologies, it can be adjusted with the introduction of a cut-off in the analysis (a lower CT threshold, as 38, in our case). The two positive results obtained only by NewGene™ qPCR may be explained by its higher sensitivity or also by the randomness of the selection of colonies for identification. It strongly depends on the differential ability of the selective agar employed to clearly differentiate *L. monocytogenes* colonies. Another explanation of higher sensitivity of NewGene™ qPCR in comparison with BAX™ may be related with the additional DNA purification step recommended by the NewGene™ manufacturer, proposed to clean inhibitors and to concentrate DNA in PCR reactions. Hoffman & Wiedmann (2001) had already described the susceptibility of the BAX™ system for *L. monocytogenes* in attaining false negative results. In their study, the sensitivity was defined in 84.8%, comparable to the found previously for Norton *et al.* (2000), with a sensitivity of 82.2%. The authors attributed this feature to the outcompetition by other strains of *Listeria* including *L. innocua* during enrichment.

Results with high bacterial genome concentration with negative results by culture procedures (27.3% of positive cases) may be explained by two hypothesis: detection of death organisms by molecular techniques (false positives), or presence of *L. monocytogenes* inviable for isolation (false negatives). The first hypothesis, were already tested by Klein & Juneja (1997) and Norton & Batt (1999), where they showed that death *L. monocytogenes* were detected by PCR techniques. They showed that RNA analysis is more related with alived cells when compared with DNA analysis.

This procedure is easy to perform and could be tested in further studies. The second hypothesis could be related with samples with high populations of other species of genus *Listeria* that could overgrow during enrichment step, interfering in *L. monocytogenes* isolations (Petran & Swanson, 1993). This hypothesis could be considered in our study, since all of these cases *Listeria monocytogenes* were not confirmed although other *Listeria* species were isolated by conventional culture (data not shown). In the other hand this discrepancy between microbiological and molecular techniques could be also explained by presence of injured *L. monocytogenes* as result of processing treatments such as heating, freezing, exposure to acids, or exposure to sanitizing compounds. Selective agents in enrichment media may inhibit and detection of sub lethally injured *Listeria* (Donnelly, 2002).

There are many factors that can affect the sensitivity of a PCR in food microbiological analyses including the presence of inhibitors in the food matrix, detection of viable but no cultivable cells, primer specificity and the option for direct detection or use of an enrichment step. The aim in all cases is to improve sensitivity of PCR detection but most of the information reported is related to artificially contaminated food. However, Niederhauser *et al.* (1992) demonstrated that artificially contaminated food samples are not appropriate for the development of detection methods for *L. monocytogenes* in food. In their study, the authors concluded that in contrast to fully viable *L. monocytogenes* used for contamination, bacteria present in natural food samples have reduced viability, requiring a period of recovery before they regain full growth potential. *L. monocytogenes* can be sublethally stressed by environmental challenges as had already been demonstrated by Golden *et al.* (1988).

According to Bohnert *et al.* (1992), a pre-enrichment step cannot be eliminated and it is necessary to avoid false negative results. Comi *et al.* (1991), Niederhauser *et al.* (1993) and Aznar & Alarcon, 2003, still recommend a two-step enrichment to allow high sensitivity. Both commercial Real Time PCR kits, BAX™ and NewGene™, are based on a pre-enrichment culture; the last one, still has a DNA extraction and purification step that offers the advantage of diluting out potential PCR inhibitors (Rossen *et al.*, 1991). Moreover, pre-enrichment represents a step of dilution out any nonviable cells that may be present (Klein & Juneja, 1997).

Favorable differentials of Real Time PCR assays are related with its 96 well microplate format, allowing to fast analyze large numbers of samples using universal

reagents (facilitating standardization), and to test of multiple targets on a same batch. In addition, the elimination of the manipulation of PCR products significantly reduces the risk of cross-contamination decreasing the incidence of false positive results. The Real Time PCR assays demonstrated to be as sensitive as conventional culture methods besides reduce significantly the time taken for detection. The time required for enrichment was about 24 h, plus 2 h for the DNA extraction and more approximately 2.5 h for the thermal cycling, with results available immediately in the end. Furthermore, the use of fast, sensitive, and practice methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in food industry can optimize the determination of the critical points of contamination in production process and the quality control of food products, reducing the risk to the consumer.

ACKNOWLEDGEMENTS

This present work was supported by FINEP. We would like to express our gratitude to SIMBIOS BIOTECNOLOGIA, for the technical assistance.

REFERENCES

- ALTEKRUSE S.F., COHEN M.L, SWERDLOW D.L.. Emerging foodborne diseases. *Emerg Infect Dis.*, v. 3, p. 285-293, 1997.
- AZNAR R. & ALARCON B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. *Journal of Applied Microbiology*, v. 95, p. 958-966, 2003.
- BERRADA H., SORIANO J.M., PICO Y., MANES J. Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real time quantitative PCR. *Int J Food Microbiol.*, v.107, p. 202-206, 2006.
- BOHNERT M., DILASSER F., DALET C., MENGAUD J., COSSART P. Use of specific oligonucleotides for direct enumeration of *Listeria monocytogenes* in food samples by colony hybridization and rapid detection by PCR. *Research Microbiology*, v. 143, p. 271-280, 1992.
- BOOM R., SOL C.J.A., SALIMANS M.M.M., JANSEN C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN P.M.E., VAN DER NOORDAA J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, p. 495-503, 1990.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Multistate outbreak of listeriosis—United States, 2000. *Morb. Mortal. Wkly.*, v. 49, p. 1129-1130, 2000.
- COMI G., VALENTI M., CIVILINI M., FUMAGALLI C., CANTONI C., DE BERTOLDI M. Evaluation of an enzymatic method for fast identification of *Listeria* spp. in cheese and meat products. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin*, v. 192, p. 134-145, 1991.
- CURTIS G.D.W. & LEE W.H.. Culture media and methods for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 26, p. 1-13, 1995.
- DALTON C.B., AUSTIN C.C., SOBEL J., HAYES P.S., BIBB W.F., GRAVES L.M., SWAMINATHAN B., PROCTOR M.E., GRIFFIN P.M. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. Med.*, v. 336, p. 100-105, 1997.
- DONNELLY C.W. Detection and isolation of *Listeria monocytogenes* from food samples: implications of sublethal injury. *J AOAC Int.* 85(2):495-500. 2002.
- FARBER J. M. & PETERKIN P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.*, v. 55, p. 476-511, 1991.
- GALLAGHER L., EBEL E.D., KAUSE J. R. Draft FSIS risk assessment for *Listeria* in ready-to-eat meat and poultry products. *Food Safety and Inspection Service*. Washington, D.C. 2003.

- GOLDEN D. A., BEUCHAT L. R., BRACKETT R. E. Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as affected by heating and freezing. *Food Microbiol.*, v. 5, p. 17-23, 1988.
- GUILBAUD M., DE COPPET P., BOURION F., RACHMAN C., PREVOST H., DOUSSET X. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in biofilms by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.*, v. 71, p. 2190-2194, 2005.
- HIGUCHI R., FOCKLER C., DOLLINGER G., WATSON R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology*, v. 11, p. 1026-1030, 1993.
- HOFFMAN A.D. & WIEDMANN M. Comparative evaluation of culture- and BAX polymerase chain reaction-based detection methods for *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in environmental and raw fish samples. *J Food Prot.*, v. 64, p. 1521-1526, 2001.
- HOCHBERG A.M., ROERING A., GANGAR V., CURIALE M., BARBOUR W.M., MROZINSKI P.M. Sensitivity and specificity of the BAX for screening/*Listeria monocytogenes* assay: internal validation and independent laboratory study. *J AOAC Int.* v. 84(4): p. 1087-97. 2001.
- HOUGH A.J., HARBISON S.A., SAVILL M.G., MELTON L.D., FLETCHER G. Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction. *J Food Prot.*, v. 65, p.1329-1332, 2002.
- HUDSON J.A. & MOTT S.J. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on smoked salmon under refrigeration and milk temperatures abuse. *Food Microbiol.*, v. 10, p. 61-68, 1993.
- JUNGE B. & BERGHOF-JAGER K. Roche/BIOTECON Diagnostics LightCycler foodproof *L. monocytogenes* detection kit in combination with ShortPrep foodproof II Kit. Performance-Tested Method 070401. *J AOAC Int.*, v. 89, p. 374-98, 2006.
- KATHARIOU S. Pathogenesis determinants of *Listeria monocytogenes*, p. 295-314. In Cary J.W., Linz J., Bhatnagar D. (ed.). *Microbial foodborne diseases: mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis.* Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, Pa. 1999.
- KATHARIOU S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J. Food Prot.*, v. 65, p. 1811-1829, 2002.
- KLEIN D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol. Med.*, v. 8, p. 257-260, 2002.
- KLEIN P.G. & JUNEJA V.K. Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.*, v. 63, p. 4441-4448, 1997.
- KUHN M. & GOEBEL W. Molecular studies on the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Genet. Eng.*, v. 17, p. 31-51, 1995.

- MEAD P.S., SLUTSKER L., DIETZ V., McCAING L.F., BRESEE J.S., SHAPIRO C., GRIFFIN P.M., TAUXE R. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, v. 5, p. 607-624, 1999.
- MURRAY P.R.(ed.), BARON E.J., PFALLER M.A., TENOVER F.C., YOLKEN R.H. Manual of Clinical Microbiology. 7.ed. Washington, D.C.: *American Society for Microbiology*, 1999.
- NGUYEN L.T., GILLESPIE B.E., NAM H.M., MURINDA S.E., OLIVER S.P. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in beef products by real-time polymerase chain reaction. *Foodborne Pathog Dis.*, v. 1, p. 231-240, 2004.
- NIEDERHAUSER C., CANDRIAN U., HÖFELEIN C., JERMINI M., BÜHLER H.-P., LÜTHY J. Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, p. 1564-1568, 1992.
- NIEDERHAUSER C., HÖFELEIN C., LÜTHY J., KAUFMANN U., BÜHLER H.P., CANDRIAN U. Comparison of "Gen-Probe" DNA probe and PCR for detection of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated soft cheese and semi-soft cheese. *Research in Microbiology*, v. 144, p. 47-54, 1993.
- NOGVA H.K., RUDI K., NATERSTAD K., HOLCK A., LILLEHAUG D. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Appl Environ Microbiol.*, v. 66, p. 4266-4271, 2000.
- NORTON D.M. & BATT C.A. Detection of viable *Listeria monocytogenes* with a 5' nuclease PCR assay. *Appl Environ Microbiol.*, v. 65, p. 2122-2127, 1999.
- NORTON D.M., MCCAMEY M., BOOR K.J., WIEDMANN M. Application of the BAX for screening/genus *Listeria* polymerase chain reaction system for monitoring *Listeria* species in cold-smoked fish and in the smoked fish processing environment. *J Food Prot.*, v. 63, p. 343-346, 2000.
- O'CONNOR L., JOY J., KANE M., SMITH T., MAHER M. Rapid polymerase chain reaction/ DNA probe membrane-based assay for the detection of *Listeria* and *Listeria monocytogenes* in food. *J Food Prot.*, v. 63, p. 337-342, 2000.
- PECCIO A., AUTIO T., KORKEALA H., ROSMINI R., TREVISANI M. *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 37, p. 234-238, 2003.
- PETTRAN R.L. & SWANSON K.M.J. Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *J. Food Prot.*, v. 7, p. 616-618, 1993.
- PHILLIPS C. *Listeria monocytogenes*, p. 63-68. In (ed.) Food, bacteria and health. A practical guide. Chandos Publishing Limited, Oxford, England. 1998.
- RODRIGUEZ-LAZARO D., HERNANDEZ M., SCORTTI M., ESTEVE T., VAZQUEZ-BOLAND J.A., PLA M. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and

- Listeria innocua* by real-time PCR: assessment of hly, iap, and lin02483 targets and AmpliFluor technology. *Appl Environ Microbiol.*, v. 70, p. 1366-1377, 2004a.
- RODRIGUEZ-LAZARO D., JOFRE A., AYMERICH T., HUGAS M., PLA M. Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.*, v. 70, p. 6299-6301, 2004b.
- ROSSEN L., HOLMSTROM K., OLSEN J.E., RASMUSSEN O.F. A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. *Int J Food Microbiol.*, v. 14, p. 145-151, 1991.
- RUDI K., NATERSTAD K., DROMTORP S.M., HOLO H. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. *Lett Appl Microbiol.*, v. 40, p. 301-306, 2005.
- SAMELIS J. & METAXOPOULOS J. Incidence and principal sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. *Food Microbiol.*, v. 16, p. 465-477, 1999.
- SCHLECH W.F., LAVIGNE P.M., BORTOLUSSI R.A., ALLEN A.C., HALDANE E.V., WORT A.J., HIGHTOWER A.W., JOHNSON S.E., KING S.H., NICHOLLS E.S., BROOME C.V. Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.*, v. 308, p. 203-206, 1983.
- SCHUCHAT A., SWAMINATHAN B., BROOME C.V. Epidemiology of human listeriosis. *Clin. Microbiol.*, v. 4, p. 169-183, 1991.
- STEWART D. & GENDEL S.M. Specificity of the BAX polymerase chain reaction system for detection of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. *J AOAC Int.*, v. 81, p. 817-822, 1998.
- VAZQUEZ-BOLAND J.A., KUHN M., BERCHE P., CHAKRABORTY T., DOMINGUEZ-BERNAL G., GOEBEL W., GONZALEZ-ZORN B., WEHLAND J., KREFT J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol.*, v. 14, p. 584-640, 2001.

Figure 1 – NewGene™ detection and amplification. Representative amplification plot is shown. Serial dilutions of *L. monocytogenes* genomic DNA, equivalent to 1×10^5 , 2×10^4 , 4×10^3 , 8×10^2 , 161, 32, 6 and 1 target molecules per reaction were used. Insets show representative curves generated from the amplification data.

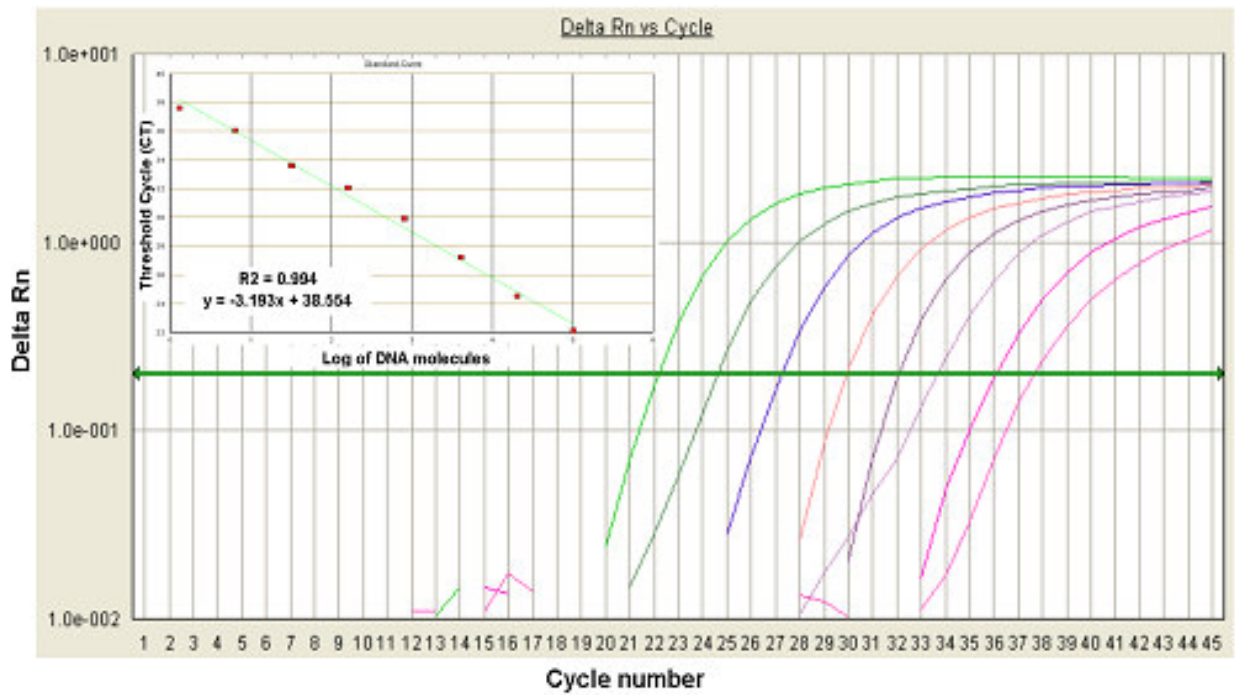


Table 1 - Comparative results for *Listeria monocytogenes* detection by three methods.

		Culture^a		
		positive	negative	total
BAX^b	positive	10	6	16
	negative	4	78	82
	total	14	84	98
NewGene^c	positive	14	8	22
	negative	0	76	76
	total	14	84	98

^aconventional culture (ISO 11290-1); ^bBAXTM system for screening of *Listeria monocytogenes*; ^c NewGeneTM quantitative polymerase chain reaction.

Table 2 - Comparison of sensitivity, specificity, accuracy and kappa index between commercial methods for *Listeria monocytogenes* detection. These 2 assays were compared with conventional culture results.

	Culture^a as "gold standard"			
	Sensibility (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	kappa index
BAX^b	71.4	92.9	89.8	0.607
NewGene^c	100.0	90.5	91.8	0.731

^aconventional culture (ISO 11290-1); ^bBAXTM system for screening of *Listeria monocytogenes*; ^c NewGeneTM quantitative polymerase chain reaction.

Table 3 - Number of *Listeria monocytogenes* positive samples (% number positive samples/total positives) detected by 3 procedures (NewGene™, BAX™ systems and culture)

NewGene^a		(genome Equivalent/mL)		N^o of samples	%	Culture^b	BAX^c
Qty average	Qty SD	Lower	Upper				
190,835	285,328	4,000	690,000	10	45.5	+	+
335,318	254,988	186,000	850,000	6	27.3	-	+
783	1,269	70	2,700	4	18.2	+	-
430	163	300	550	2	9.1	-	-
total				22	100	14	16

^a NewGene™ quantitative polymerase chain reaction, ^bconventional culture (ISO 11290-1); ^cBAX™ system for screening of *Listeria monocytogenes*.

Table 4 - Detection and quantification limits of NewGene™ assay with diluted genomic DNA of *L. monocytogenes*.

Approx n° of template molecules	Approx n° of copies/ mL	Signal ratio (positive signals/ 10 reactions)	CT value		% detection
			Mean	SD	
100,651	25,162,711	10	22.4	0.2	100
20,130	5,032,542	10	24.8	0.3	100
4,026	1,006,508	10	27.3	0.3	100
805	201,302	10	29.9	0.3	100
161	40,260	10	32.1	0.3	100
32	8,052	10	34.6	0.5	100
6	1,610	8	38.7	1.7	80
1	322	3	39.7	2.5	30

CAPÍTULO III

PERSPECTIVAS E CONCLUSÕES

Na tentativa de buscar métodos rápidos e sensíveis para a detecção de *Listeria monocytogenes*, diversos métodos foram desenvolvidos. Ensaio rápidos baseados em testes imunológicos, hibridização e amplificação de ácidos nucleicos, oferecem mais sensibilidade e especificidade do que métodos baseados em cultura, além de permitirem a redução do tempo para obtenção de resultados. Muitos destes métodos atingiram um elevado nível de automação, facilitando sua aplicação na detecção rotineira de microrganismos (Norton, 2002).

Os métodos para cultivo microbiológicos são de aplicação rotineira pelos laboratórios e indústrias alimentícias, entretanto, além da demora na obtenção de resultados, existe a possibilidade de ocorrência de resultados falso-negativos em decorrência da sobreposição de populações de outras espécies de *Listeria*, ou outros microrganismos acompanhantes. Os resultados falso negativos podem ter origem também nas situações onde as células da *L. monocytogenes* estão injuriadas não podendo recuperar-se nos meios empregados. Apesar disso, os métodos microbiológicos convencionais apresentam a grande vantagem de serem utilizados já há muito tempo e de serem reconhecidos como oficiais, tanto nacional como internacionalmente.

Dentre os métodos comerciais disponíveis baseados em PCR em tempo real, o sistema BAXTM system foi colocado no mercado em novembro de 2000 e o USDA/FSIS aprovou-o como método para detectar *L. monocytogenes* em produtos cárneos em 2002 (FSIS, 2002). No Brasil, o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), conforme Instrução Normativa nº 40, de 12 de dezembro de 2005 (Brasil, 2004), aprovou o sistema como padrão oficial para Análise de Microbiologia de Produtos de Origem Animal para o isolamento e identificação de *L. monocytogenes* em carne vermelha, carne de ave, ovos e amostras ambientais. Este kit comercial apresenta a vantagem de ser rápido, ter desempenho comparável ao do método convencional, porém apresenta como desvantagem seu elevado custo por reação.

A metodologia molecular baseada na Taqman™ PCR descrita por Rodríguez-Lázaro *et al.* (2004a) está atualmente disponível na forma de kit comercial e é produzida por uma empresa nacional. Este trabalho demonstrou que este kit é de fácil execução, rápido, específico e com desempenho comparável aos métodos microbiológico convencional e ao BAX™ na análise de produtos alimentares à base de frango. Além disso, esta técnica apresenta a possibilidade de quantificação a partir da análise direta de alimentos, reduzindo ainda mais o tempo para o fechamento do diagnóstico.

Este trabalho limitou-se a avaliação de alimentos à base de carne de frango, sendo recomendável assim uma abordagem semelhante (comparação de técnicas de detecção de *Listeria monocytogenes*), a partir de outras matrizes alimentares. A literatura descreve variações na eficiência dos testes conforme a matriz alimentar utilizada. Neste sentido seria possível avaliar a aplicação e a confirmação da similaridade de resultados entre as diferentes metodologias (ausência de diferença estatística significativa), a fim direcionar a escolha de um melhor procedimento a ser adotado.

A introdução do real time PCR no controle de qualidade de alimentos, deveria ser seriamente considerada pelas indústrias alimentícias e laboratórios que realizam testes de detecção. As técnicas moleculares, já estão se tornando realidade em nosso país, o que permite a introdução de um método sensível e rápido para detecção de *Listeria monocytogenes* (29 horas para obtenção de resultados positivos e negativos).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAK G.K., LONG S.M., O'BRIEN S.J. Intestinal infection: Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut*, v. 51, p. 832-841, 2002.
- AOAC INTERNATIONAL (AOAC). *Listeria monocytogenes* – Chapter 15: In CUNNIFF P.A., *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Gaithersburg, MD: AOAC International, p. 94a-98, 1999. Disponível em: <http://seafood.ucdavis.edu/HACCP/Compendium/Chapt15.htm>. Acesso em: 01 Jul. 2006.
- AZNAR R. & ALARCON B. On the specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in food: a comparison of published primers. *Syst Appl Microbiol.*, v. 25, p. 109-119, 2002.
- BANSAL N.S. Development of a polymerase chain reaction assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Lett Appl Microbiol.*, v. 22, p. 353-356, 1996.
- BESSESEN M.T., LUO Q.A., ROTBART H.A., BLASER M.J., ELLISON R.T. Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.*, v. 56, p. 2930-2932, 1990.
- BEUCHAT L.R. *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. *Food Control*, v. 7, p. 223-228, 1996.
- BORDER P.M., HOWARD J.J., PLASTOW G.S., SIGGENS K.W. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol.*, v. 11, p. 158-162, 1990.
- BRASIL. Instrução Normativa nº41, de 7 de junho de 2004. Validação da metodologia utilizada pelo sistema de detecção patogênica para alimentos e amostras ambientais – A.bax[®] para detecção de *Salmonella spp.* em amostras de alimentos, água e amostras ambientais (swab), como método alternativo equivalente ao método de referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Diário Oficial da União, Brasília, n.113, 15 jun. 04. Seção 1, p. 3-6. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/page/mapa/legislacao/publicacoes_dou/publicacoes_dou_2004/publicacoes_dou_junho_2004/do1_15.06.2004-mapa53682.pdf. Acesso em: 26 dez. 2006.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Preliminary FoodNet Data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – selected sites – United States. Surveillance Summaries. *MMWR*, v. 55, 2006. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5510a1.htm>. Acesso em: 07 dez. 2006.

- COCOLIN L., RANTSIOU K., IACUMIN L., CANTONI C., COMI G. Direct identification in food samples of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. *Appl Environ Microbiol.*, v. 68, p. 6273-6282, 2002.
- D'AGOSTINO M., WAGNER M., VAZQUEZ-BOLAND J.A., KUCHTA T., KARPISKOVA R., HOORFAR J., NOVELLA S., SCORTTI M., ELLISON J., MURRAY A., FERNANDES I., KUHN M., PAZLAROVA J., HEUVELINK A., COOK N. A validated PCR-based method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model-towards an international standard. *J Food Prot.*, v. 67, p. 1646-1655, 2004.
- DENEER H.G. & BOYCHUK I. Species-specific detection of *Listeria monocytogenes* by DNA amplification. *Appl Environ Microbiol.*, v. 57, p. 606-609, 1991.
- DONNELLY C.W. Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. In: RYSER, E.T., MARTH, E.H. *Listeria, listeriosis, and food safety*. 2.ed. New York: Marcel Dekker, p. 225-260, 1999.
- FAO/WHO. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: interpretative summary. Microbiological Risk Assessment Series, No. 4. (Geneva, Switzerland), 2004.
- FARBER J.M., COATES F., DALEY E. Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.15, p.103-105, 1992.
- FARBER J.M. & PETERKIN P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.*, v. 55, p. 476–511, 1991.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. 2003. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/lmr2-2.html#Listeriosis>. Acesso em: 13 jul. 2006.
- FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. FSIS adopts new screening method for *Listeria monocytogenes*. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/oa/news/2002/bax.htm>. Acesso em: 26 dez. 2006.
- FRANCO B.D.G.M. & LANDGRAF M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 182p, 1996.
- GALLAGHER L., EBEL E.D., KAUSE J. R. Draft FSIS risk assessment for *Listeria* in ready-to-eat meat and poultry products. *Food Safety and Inspection Service*. Washington, D.C. 2003.
- GANGAR V., CURIALE M.S., D'ONORIO A., SCHULTZ A., JOHNSON R.L., ATRACHE V. VIDAS enzyme-linked immunofluorescent assay for detection of *Listeria* in foods: collaborative study. *J AOAC Int.*, v. 83, p. 903-918, 2000.
- GRAVANI R. Incidence and control of *Listeria* in food-processing facilities, p. 657–709. In RYSER E.T. & MARTH E.H. (ed.). *Listeria, listeriosis, and food safety*. 2 ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999.

- GERMANO P.M.L. & GERMANO M.I.S. *Higiene e vigilância sanitária de alimentos*. São Paulo: Varela, 629p, 2001.
- GOUIN E., MENGAUD J., COSSART P. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. *Infect. Immun.*, v. 62, p. 3550-3553, 1994.
- HEARTY S., LEONARD P., QUINN J., O'KENNEDY R. Production, characterisation and potential application of a novel monoclonal antibody for rapid identification of virulent *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Methods*, v. 66, p. 294-312, 2006.
- HEID C.A., STEVENS J., LIVAK K.J., WILLIAMS P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, v. 6, p. 986-994, 1996.
- HENSYL W.R. (ed). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9 ed. Imprenta Baltimore: Willians & Wilkins, 787p, 1994.
- HITCHINS A.D. *Listeria monocytogenes*. Cap.10, p.10.01-10.13 In: UNITED STATES. Food and Drug Administration. *Bacteriological analytical manual*. 8 ed. AOAC International, 1998.
- HUGHES D., DAILIANIS A., DUNCAN L., BRIGGS J., MCKINTYRE D.A., SILBERNAGEL K. Modification of enrichment protocols for TECRA *Listeria* Visual Immunoassay method 995.22: collaborative study. *J AOAC Int.*, v. 86, p. 340-354, 2003.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Microrganisms in foods 5*. In: *Microbiological specifications of food pathogens*. London: Blakie Academic & Professional, Descr. Fis. 513p, 1996.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes – Part 1: Detection method*, International Standard ISO 11290-1: 1996, Geneva, Switzerland. Disponível em: <http://www.iso.org/iso/em/CatalogueListPage.CatalogueList>. Acesso em: 5 jul. 2006.
- JAY J. M. Foodborne listeriosis, p. 478-506. In HELDMAN D.R. (ed.). *Modern food microbiology*. 5 ed. New York: Chapman & Hall, 1996.
- JIANG J., LARKIN C., STEELE M., POPPE C., ODUMERU J.A. Evaluation of universal preenrichment broth for the recovery of foodborne pathogens from milk and cheese. *J Dairy Sci.*, v. 81, p. 2798-2803, 1998.
- JOHNSON J.L. *USDA-FSIS microbiology laboratory guidebook*. Washington: U.S. Department of Agriculture, v.1, 1998.
- KÄFERSTEIN F. & ABDUSSALAM M. Food Safety in the 21st Century. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 77, p. 347-351, 1999.

- KIM S.H., PARK M.K., KIM J.Y., CHUONG P.D., LEE Y.S., YOON B.S., HWANG K.K., LIM Y.K. Development of a sandwich ELISA for the detection of *Listeria spp.* Using specific flagella antibodies. *J Vet Sci.*, v. 6, p. 41-46, 2005.
- LIU D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, v. 55, p. 645–659, 2006.
- MAKINO S., OKADA Y., MARUYAMA T. A new method for direct detection of *Listeria monocytogenes* from foods by PCR. *Appl Environ Microbiol.*, v. 61, p. 3745-3747, 1995.
- MEAD P.S., SLUTSKER L., DIETZ V., McCAING L.F., BRESEE J.S., SHAPIRO C., GRIFFIN P.M., TAUXE R. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, v. 5, p. 607-624, 1999.
- MIKASOVA E., ORAVCOVA K., KACLIKOVA E., KUCHTA T., DRAHOVSKA H. Typing of food-borne *Listeria monocytogenes* by polymerase chain reaction-restriction enzyme analysis and amplified fragment length polymorphism. *New Microbiol.*, v. 28, p. 265-270, 2005.
- MURRAY P.R.(ed.), BARON E.J., PFALLER M.A., TENOVER F.C., YOLKEN R.H. Manual of Clinical Microbiology. 7.ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1999.
- NAVAS J., ORTIZ S., LOPEZ P., JANTZEN M.M., LOPEZ V., MARTINEZ-SUAREZ J.V. Evaluation of Effects of Primary and Secondary Enrichment for the Detection of *Listeria monocytogenes* by Real-Time PCR in Retail Ground Chicken Meat. *Foodborne Pathog Dis.*, v. 3, p. 347-354, 2006.
- NIEDERHAUSER C., CANDRIAN U., HOFELEIN C., JERMINI M., BUHLER H.P., LUTHY J. Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Appl Environ Microbiol.*, v. 58, p. 1564-1568, 1992.
- NORTON D.M. Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples. *J AOAC Int.*, v. 85, p. 505-515, 2002.
- O'CONNOR L., JOY J., KANE M., SMITH T., MAHER M. Rapid polymerase chain reaction/ DNA probe membrane-based assay for the detection of *Listeria* and *Listeria monocytogenes* in food. *J Food Prot.*, v. 63, p. 337-342, 2000.
- PATEL J.R. & BEUCHAT L.R. Evaluation of enrichment broths for their ability to recover heat-injured *Listeria monocytogenes*. *J Appl Bacteriol.*, v. 78, p. 366-372, 1995.
- PETTRAN R.L. & SWANSON K.M.J. Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *J. Food Prot.*, v. 7, p. 616-618, 1993.
- PHILLIPS C. *Listeria monocytogenes*, p. 63–68. In: *Food, bacteria and health. A practical guide*. England: Chandos Publishing Limited, 1998.

- ROBINSON B.J. Immunodiagnostics in the detection of foodborne pathogens. In: TORTELLO M.L., GENDEL S.M. *Food Microbiological Analysis*. New York: Marcel Dekker, p. 69-89, 1997.
- ROCOURT J. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E.T. & MARTH, E.H. *Listeria*, listeriosis, and food safety. 2 ed. New York: Marcel Dekker, p.1-20, 1999.
- ROCOURT J., MOY G., VIERK K., SCHLUNDT J. The present state of foodborne disease in OECD countries. Geneva: WHO/ FSD/ 2003, 2003.
- RODRIGUEZ-LAZARO D., HERNANDEZ M., SCORTTI M., ESTEVE T., VAZQUEZ-BOLAND J.A., PLA M. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: assessment of hly, iap, and lin02483 targets and AmpliFluor technology. *Appl Environ Microbiol.*, v. 70, p. 1366-1377, 2004a.
- RODRIGUEZ-LAZARO D., JOFRE A., AYMERICH T., HUGAS M., PLA M. Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.*, v. 70, p. 6299-6301, 2004b.
- RYSER E.T. & DONNELLY C.W. *Listeria*. In: DOWNES, F.P. & ITO, K. (eds). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4 ed. Washington: APHA, p. 343-353, 2001.
- SALAMINA G., DONNE E.D., NICCOLINI A., PODA G., CESARONI D., BUCCI M., FINI R., MALDINI M., SCHUCHAT A., SWAMINATHAN B., BIBB W., ROCOURT J., BINKIN N., SALMOSO S. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. *Epidemiol. Infect.*, v. 117, p. 429- 436, 1996.
- SEWELL A.M., WARBURTON D.W., BOVILLE A., DALEY E.F., MULLEN K. The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria spp.* from foods. *Int J Food Microbiol.*, v. 81, p. 123-129, 2003.
- SIGGENS K.W. Polymerase chain reaction for the detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes*. *Methods Mol Biol.*, v. 46, p. 237-246, 1995.
- SILBERIAGEL K.M., CARVER C.N., JECHOREK R.P., JOHNSON R.L. Evaluation of VIDAS *Listeria monocytogenes* II (LMO2) immunoassay method for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods: collaborative study. *J AOAC Int.*, v. 87, p. 1123-1132, 2004.
- SILBERNAGEL K.M., JECHOREK R.P., KAUFER A.L., JOHNSON R.L., ALEO V., BROWN B., BUEN M., BURESH J., CARSON M., FRANKLIN J., HAM P., HUMES L., HUSBY G., HUTCHINS J., JECHOREK R., JENKINS J., KAUFER A., KEXEL N., KORA L., LAM L., LAU D., LEIGHTON S., LOFTIS M., LUC S., MARTIN J., NACAR I., NOGLE J., PARK J., SCHULTZ A., SEYMORE D., SMITH C., SMITH J., THOU P., ULMER M., VOSS R., WEAVER V. Evaluation of the VIDAS *Listeria* (LIS) immunoassay for the detection of *Listeria* in foods using demi-Fraser and Fraser enrichment broths, as modification of AOAC

Official Method 999.06 (AOAC Official Method 2004.06). *J AOAC Int.*, v. 88, p. 750-760, 2005.

- SLUTSKER L. & SCHUCHAT A. Listeriosis in humans. In: RYSER, E.T. & MARTH, E.H. *Listeria, listeriosis, and food safety*. 2.ed. New York: Marcel Dekker, p.75-96, 1999.
- SOMER L. & KASHI Y. A PCR method based on 16S rRNA sequence for simultaneous detection of the genus *Listeria* and the species *Listeria monocytogenes* in food products. *J Food Prot.*, v. 66, p. 1658-1665, 2003.
- SWAMINATHAN B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE M.P., BEUCHAT L.R., MONTVILLE T.J. (eds). *Food microbiology fundamentals and frontiers*. Washington: ASM Press, p.383-409, 2001.
- TOMPKIN R.B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J. Food Prot.*, v. 65, p. 709-725, 2002.
- TULLY E., HEARTY S., LEONARD P., O'KENNEDY R. The development of rapid fluorescence-based immunoassays, using quantum dot-labelled antibodies for the detection of *Listeria monocytogenes* cell surface proteins. *Int J Biol Macromol.*, v. 39, p. 127-134, 2006.
- UNNERSTAD H., NILSSON I., ERICSSON H., DANIELSSON-THAM M.L., BILLE J., BANNERMAN E., THAM W. Division of *Listeria monocytogenes* serovar 1/2a strains into two groups by PCR and restriction enzyme analysis. *Appl Environ Microbiol.*, v. 65, p. 2054-2056, 1999.
- USER'S GUIDE. BAX™ System PCR assay with automated detection for bacterial screening. Wilmington, DE.: Du Pont Qualicon, 2000.
- WHO. *Microbial Contamination of secrets foods*. 156p, 1996.
- YU K.Y., NOH Y., CHUNG M., PARK H.J., LEE N., YOUN M., JUNG B.Y., YOUN B.S. Use of monoclonal antibodies that recognize p60 for identification of *Listeria monocytogenes*. *Clin Diagn Lab Immunol.*, v. 11, p. 446 – 51, 2004.
- ZHENG W. & KATHARIOU S. Differentiation of epidemic-associated strains of *Listeria monocytogenes* by restriction fragment length polymorphism in a gene region essential for growth at low temperatures (4°C). *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 61, p. 4310-4314, 1995.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)