

POLIANA BERGAMIN ATHAYDE DE SOUZA

AVALIAÇÃO DE *Listeriamonocytogenes* EM MELÃO E JABUTICABA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S729a
2014 Souza, Poliana Bergamin Athayde de, 1989-
Avaliação de *Listeria monocytogenes* em melão e
jaboticaba / Poliana Bergamin Athayde de Souza. – Viçosa, MG,
2014.
xii, 58f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Nélio José de Andrade.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.43-58.

1. Alimentos frescos. 2. Listeriose. 3. Frutas.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia
de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 615.95293

POLIANA BERGAMIN ATHAYDE DE SOUZA

AVALIAÇÃO DE *Listeria* spp. E *Listeria monocytogenes* EM MELÃO E JABUTICABA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de agosto de 2014.

Maria Cristina Dantas Vanetti
(Coorientadora)

Wilmer Edgard Luera Peña
(Coorientador)

Maria Aparecida Antunes

Nélio José de Andrade
(Orientador)

Dedico este trabalho,

À Deus, que ilumina, guia e protege todos os meus passos.

Aos meus pais, que com muito amor, suor e lágrimas possibilitaram que todas as minhas vitórias pudessem ser alcançadas.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe
faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

AGRADECIMENTOS

Sobretudo a Deus pelo dom da vida;

Aos meus pais Clemilda e Luiz pelo apoio incondicional. A vocês, minha eterna gratidão;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pela oportunidade;

À Universidade Federal de Lavras pelo enorme apoio a qualificação;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudos;

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento do projeto;

Ao Professor Nélio José de Andrade pelo humanismo, empatia, amor, paciência, orientação, conselhos e ensinamentos;

Ao Professor Wilmer Edgard Luera Peña por sempre acreditar na minha capacidade;

À Professora Maria Cristina Dantas Vanetti pela enorme contribuição no conteúdo deste trabalho, além da excelente orientação, respeito e ensinamentos transmitidos;

Ao Instituto Oswaldo Cruz pela realização e análise dos testes sorológicos;

Às Professoras Roberta Hilsdorf Piccoli e Monique Renon Eller pela colaboração e sugestões para o trabalho;

Às colegas Roberta Barbosa, Mayra Carla e Hiasmyne Medeiros pelo enorme apoio e colaboração;

Ao Josimar Elerati por sempre me ajudar com tanta gentileza;

À Suzanny Mendes, pela eterna amizade incondicional;

Enfim, à todos os meus colegas do Laboratório de Higiene Industrial e Microbiologia de Alimentos e do Departamento de Ciência dos Alimentos;

Muito Obrigada.

BIOGRAFIA

POLIANA BERGAMIN ATHAYDE DE SOUZA, filha de Luiz Athayde de Souza e Clemilda da Penha Bergamin A. de Souza, nasceu na cidade de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, em 22 de Outubro de 1989.

Em 2005 iniciou o curso Técnico em Agroindústria pela Instituição Federal de Ensino Superior-IFES, tornando-se técnica em Agroindústria no ano de 2006.

Em 2007 iniciou o curso de Engenharia de Alimentos na Universidade Federal do Espírito Santo, tornando-se bacharel em 2012. No mesmo ano iniciou o curso de Pós-graduação, *stritu sensu*, em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, orientada pelo Professor Nélio José de Andrade, na linha de pesquisa Biotecnologia e Microbiologia de Alimentos.

Em 2014 assumiu o cargo de Engenheira de Alimentos no Departamento de Ciência dos Alimentos na Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, onde atua até hoje.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	viii
ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	4
2.2. Listeriose	6
2.3. Listeriose no Brasil	8
2.4. Microbiologia e segurança das frutas e hortaliças.....	9
2.5. <i>L. monocytogenes</i> em frutas.....	11
2.6. Jabuticaba: origem, cultivo, produtividade e comercialização	13
2.7. Melão: origem, cultivo, produtividade e comercialização	14
2.8. Métodos de detecção de <i>Listeria</i> spp.	16
2.8.1. <i>Reação de polimerase em cadeia (PCR)</i>	18
2.8.2. <i>Método imunoenzimático</i>	19
2.8.3. <i>Sequenciamento gênico</i>	20
2.8.4. <i>Sorotipagem</i>	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. Amostragem.....	22
3.2. Avaliação da incidência de <i>Listeria</i> spp. pela metodologia convencional	23
3.3. Avaliação da incidência de <i>L. monocytogenes</i> pelo método imunoenzimático.....	24
3.4. Identificação genética dos isolados bacterianos.....	24
3.4.1. <i>Extração de DNA das amostras</i>	24
3.4.2. <i>Amplificação de genes específicos de L. monocytogenes</i>	25
3.4.3. <i>Sequenciamento gênico dos isolados obtidos</i>	26
3.5. Sorotipagem.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	28

4.1. Avaliação da incidência de <i>Listeria</i> spp. pela metodologia convencional	28
4.2. Avaliação da incidência de <i>L. monocytogenes</i> pela metodologia imunoenzimática	29
4.3. Identificação genética dos isolados	30
4.3.1. Amplificação de genes específicos de <i>L. monocytogenes</i>	30
4.3.2. Identificação dos isolados obtidos por meio de sequenciamento gênico	32
4.3.3. Avaliação de similaridade genética entre os isolados.....	35
4.4. Sorotipagem da cepa de <i>L. monocytogenes</i> isolada de melão	38
4.5. Perigo associado ao melão e jabuticaba.....	38
5. CONCLUSÃO.....	42
6. REFERÊNCIAS.....	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para identificação de <i>L. monocytogenes</i>	25
Tabela 2- Distribuição da frequência de ocorrência de <i>Listeria</i> spp. em amostras de melão e jabuticaba pelo método de análise convencional	28
Tabela 3- Espécies de maior similaridade com os isolados sequenciados, de acordo com o alinhamento utilizando sequências contidas no banco de dados GenBank (NCBI).	33
Tabela 4- Similaridade do patógeno <i>L. monocytogenes</i> com alguns dos demais isolados	36

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Métodos de detecção de <i>L. monocytogenes</i> em alimentos.	18
Figura 2- Visualização do produto de PCR para identificação de <i>L. monocytogenes</i>	30
Figura 3- Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene 16S das espécies identificadas.....	37

RESUMO

SOUZA, Poliana Bergamin Athayde de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2014. **Avaliação de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* em melão e jabuticaba.** Orientador: Nélio José de Andrade. Coorientadores: Maria Cristina Dantas Vanetti e Wilmer Edgard LueraPeña.

A demanda dos consumidores por alimentos frescos tem crescido substancialmente nas últimas décadas. No entanto, apesar desses produtos preservarem melhor as características sensoriais e nutricionais, a contaminação por patógenos, como *L. monocytogenes*, gera preocupações crescentes. A doença infecciosa causada por esta bactéria, denominada listeriose, apresenta baixa taxa de morbidade, porém alta de mortalidade, e representa grande risco para indivíduos imunodeprimidos, gestantes, idosos e recém-nascidos. Produtos consumidos frescos são considerados de grande importância, uma vez que não passam por etapas que garantam a eliminação de patógenos, além disso, normalmente são mantidos sob refrigeração, condição na qual *L. monocytogenes* se multiplica, possibilitando que seu crescimento se sobressaia em relação à maioria das bactérias. Diante do exposto, a ocorrência de *L. monocytogenes* foi pesquisada em duas frutas que normalmente são consumidas *in natura*: melão e jabuticaba. O total de 150 amostras de melão e 60 de jabuticaba, adquiridas no comércio varejista do Município de Viçosa-MG, foram submetidas a análises laboratoriais. Por meio de análise convencional, utilizando a metodologia ISO 11290-1, 21 isolados de *Listeria* spp. foram encontrados nos frutos de melão, dos quais, somente 14 foram confirmados, por meio de sequenciamento gênico. A presença de *L. monocytogenes* foi avaliada por análise imunoanalítica através do kit VIDAS®-LMO e por técnica de PCR. Uma estirpe de *L. monocytogenes* foi encontrada pela reação de PCR, no entanto, este resultado diferiu daquele obtido pelo teste imunoanalítico, o qual indicou ausência de *L. monocytogenes* e apresentou uma taxa de 3,12% de resultados falsos-negativos. A sorotipagem da cepa foi realizada pelo Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz) e o sorotipo identificado foi o 1/2b, um dos mais associados a casos de listeriose humana no mundo, o que sugere o potencial da cepa em provocar a doença. Os resultados obtidos evidenciam que o melão é uma potencial fonte de *L. monocytogenes* e que

medidas de controle e prevenção deste patógeno devem ser adotadas com maior severidade para produtos que normalmente são consumidos frescos, como as frutas.

ABSTRACT

SOUZA, Poliana Bergamin Athayde de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2014. **Evaluation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in melon and jabuticaba.** Advisor: Nelio José de Andrade. Co-advisors: Maria Cristina DantasVanetti and Wilmer EdgardLuera Peña.

Consumer demand for fresh foods has grown substantially in recent decades. However, despite these products preserve better sensory and nutritional characteristics, contamination by pathogens, such as *L. monocytogenes*, generates increasing concerns. Infection by this bacteria, called listeriosis, has low morbidity but high mortality, and represents a high risk to immunocompromised individuals, pregnant women, elderly and children. Fresh products are considered high risk, since it does not go through steps to ensure the elimination of pathogens, in addition, are normally stored under refrigeration condition in which *L. monocytogenes* can multiply by providing conditions for growth protrudes in comparison to most bacteria. Given the above, the occurrence of *L. monocytogenes* was investigated in two fruits commonly consumed in natura: melon and jabuticaba. A total of 150 samples of melon and 60 samples jabuticaba acquired at retail in the municipality of Viçosa-MG, were subjected to laboratory analysis. Through conventional analysis using the method ISO 11290-1, 21 isolates of *Listeria* spp. were found in the fruits of melon, of which only 14 were confirmed by sequencing the gene. The presence of *L. monocytogenes* was also evaluated by the mini-VIDAS® LMO and by PCR. A strain of *L. monocytogenes* was found by PCR, however, this result differed from that obtained by immunoanalítico test, which indicated absence of *L. monocytogenes* and showed a rate of 3.12% false negative results. Serotyping of strains was performed by the Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz) and the serotyp identified was 1/2b one of the most associated with cases of human listeriosis in the world, suggesting the potential risk of to cause disease. The results evidence that the melon is a potential source of *L. monocytogenes* and that measures to control and prevent this pathogen should be adopted with greater persistence for products that are usually eaten fresh as fruit.

1. INTRODUÇÃO

A fruticultura brasileira se ampliou nos últimos anos e ganhou mais importância na economia do país. Com uma produção de 42,6 milhões de toneladas por ano, o Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, ficando atrás apenas da China e da Índia (BRAZILIAN FRUIT, 2013).

O mercado de frutas se expande cada vez mais e um grande destaque é o melão, que com 181.700 toneladas exportadas somente no ano de 2013, é atualmente a fruta mais exportada do Brasil (IBRAF, 2013).

Além das frutas clássicas de alto impacto na fruticultura nacional como o melão, muitas frutas produzidas no Brasil, ainda pouco conhecidas, possuem grande potencial de se tornarem competitivas com as espécies frutíferas tradicionais. Dentre estas, pode-se destacar a jabuticaba, que é uma fruta saborosa, exótica e tipicamente brasileira.

Apesar de possuir produção comercial baixa e restrita a determinadas áreas de ocorrência natural, a jabuticaba apresenta grande potencial econômico de comercialização devido às suas características sensoriais e nutricionais para consumo *in natura*, além disso, o estímulo à produção vem crescendo consideravelmente e seu consumo no Brasil aumenta a cada ano (FIOCRUZ, 2013).

Como são frutas amplamente consumidas na forma *in natura*, tanto o melão como a jabuticaba podem se tornar prejudiciais à saúde do consumidor se carregarem bactérias patogênicas. Vários surtos de gastroenterite humana têm sido associados ao consumo de vegetais frescos contaminados com patógenos. De modo geral, esses produtos não passam por processos que garantam a eliminação de micro-organismos patogênicos antes do seu consumo, o que aumenta os riscos de doenças associadas ao consumo desses alimentos.

Um dos patógenos que está associado à contaminação de frutas é *Listeria monocytogenes*. Este micro-organismo é amplamente distribuído na natureza e pode contaminar qualquer alimento fresco de origem animal ou vegetal.

A frequência com que se encontra *L. monocytogenes* nos alimentos, associada à elevada taxa de casos fatais da doença (20 a 30%), torna esse

micro-organismo um grave problema de saúde pública e uma preocupação para a indústria de alimentos (CDC, 2013b).

No Brasil, são escassas as informações relacionadas a surtos de listeriose com poucos registros oficiais sobre sua ocorrência. A listeriose humana é subdiagnosticada e subnotificada, não havendo muitos registros de casos associados ao consumo de alimentos contaminados (DESTRO, 2006; SILVA, 2010), o que reforça a necessidade de identificar as principais fontes de contaminação.

A análise microbiológica convencional para detecção de *L. monocytogenes* em alimentos se baseia na realização de etapas de pré-enriquecimento seletivo, para recuperação de células injuriadas, seguida de semeadura em placas contendo meios seletivos para o isolamento de *Listeria*. As colônias suspeitas são então submetidas a testes de confirmação, como provas morfológicas, bioquímicas e sorológicas. Embora confiáveis e considerados oficiais, os métodos convencionais de detecção podem ser afetados por fatores ambientais e variações na expressão gênica o que afeta o poder discriminatório das análises. Dessa forma, técnicas alternativas, confiáveis e de alto poder discriminatório, como métodos imunanalíticos e genotípicos, podem ser empregados para identificação de *L. monocytogenes*.

Avaliar a incidência de qualquer espécie do gênero *Listeria* também é importante, uma vez que a presença de *Listeria* spp. é amplamente utilizada como indicativo da presença de *L. monocytogenes* e normalmente sugere que o alimento possui condições que podem propiciar o desenvolvimento do patógeno (GRAVES, et al., 2007).

Devido à natureza ubíqua de *L. monocytogenes*, aos recentes surtos de listeriose associados ao consumo de vegetais *in natura* e a importância do Brasil no agronegócio mundial, estudos que avaliem a ocorrência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, por meio de técnicas convencionais e também alternativas, são essenciais no estabelecimento de medidas de controle adequadas para garantir a segurança microbiológica e a exploração comercial destes produtos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em melão e jabuticaba produzidos e comercializados no município de Viçosa-MG. A avaliação da presença de *Listeria* spp. por meio de metodologia convencional de análise, com posterior identificação dos isolados

obtidos, através de sequenciamento gênico, e a avaliação da presença de *L. monocytogenes* por meio de duas técnicas alternativas, uma imunanalítica, utilizando o *Kit VIDAS*[®]-LMO, e outra genotípica, utilizando a técnica de PCR.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* compreende 17 espécies conhecidas (LPSN, 2014). Dentre estas, somente *L. monocytogenes* é considerada consistentemente patogênica para o homem, embora infecções ocasionais por *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimerie* e *L. ivanoviïtenham* sido relatadas (LOPES, 2013).

L. monocytogenes apresenta a seguinte classificação taxonômica:

Filo - *Firmicutes*

Classe- *Bacilli*

Ordem - *Bacillales*

Família - *Listeriaceae*

Gênero - *Listeria*

Espécies - *L. monocytogenes*

L. grayi

L. innocua

L. welshimeri

L. ivanovii

L. seeligeri

L. marthii

L. rocourtiae

L. aquatica

L. cornellensis

L. denitrificans

L.fleischmannii

L. floridensis

L. grandensis

L. murrayi

L. riparia

L. weihenstephanensis

Todas as espécies do gênero *Listeria* são bastonetes gram-positivos, com resultados positivos nos testes de produção de catalase e negativos nos testes de oxidase (BERTSCH et al. 2013).

Listeria monocytogenes está entre os mais importantes micro-organismos causadores de infecções alimentares por ser o agente etiológico da listeriose, doença grave que possui elevada taxa de mortalidade (MANTILLA et al., 2007).

Listeria monocytogenes é uma bactéria gram-positiva, ubiqüitária, anaeróbia facultativa, não formadora de esporo e intracelular facultativa, que pode invadir e replicar-se em macrófagos e células epiteliais (DUSSURGET et al., 2004). Foi descrita pela primeira vez por Murray, Webb e Sawnnem como a causa de leucocitose mononuclear típica em coelhos (MURRAY et al., 1926). Foi isolada pela primeira vez na espécie humana no ano de 1929 por Nyfeldt em Copenhagen (NYFELDT, 1929). Este patógeno foi primeiramente classificado como “*Listerella*”. O nome do gênero foi modificado para *Listeria* em 1940 (JAY, 2005).

Esta bactéria se encontra na forma de bacilo pequeno, com 0,4 a 0,5 µm de diâmetro e 1 a 2 µm de comprimento, possui extremidades arredondadas e não produz esporos ou cápsulas. É móvel quando cultivada em temperaturas inferiores a 30 °C devido à presença de flagelos (LUDWIG et al., 2009).

As colônias de *Listeria* quando incubadas em meio sólido por 24 h apresentam-se circulares, pequenas (0,5 a 1,5 mm de diâmetro), lisas, ligeiramente convexas, translúcidas e com os bordos definidos. Entre 3 e 7 dias de incubação, estas colônias são maiores, ligeiramente opacas, podendo apresentar superfícies rugosas (LUDWIG et al., 2009).

Os micro-organismos do gênero *Listeria* são comumente encontrados em solo, vegetais em decomposição, água doce, esgoto e material fecal de várias espécies de mamíferos, aves e peixes (RYSER e DONNELLY, 2001; JAY, 2005; GIACCONE e OTTAVIANI, 2007).

Listeria monocytogenes é capaz de se desenvolver em diversos ambientes por ser resistente a ampla faixa de pH (4,1 – 9,6), tolerante a concentrações salinas elevadas (10 % a 30 %) e capaz de multiplicar-se em meios com atividade de água (Aw) mínima de 0,93 utilizando sacarose como fonte de carbono (JAY, 2005). Tolerante a congelamentos e descongelamentos sucessivos e pode multiplicar-se em uma ampla faixa de temperatura (0°C a 45°C), apresentando crescimento ótimo entre 30°C e 37°C (LIU et al., 2007;

ROCOURT e BUCHRIESER, 2007). No entanto, não é capaz de resistir às temperaturas acima de 60 °C por 30 min (LUDWIG et al., 2009).

Este micro-organismo é capaz ainda de colonizar superfícies com consequente formação de biofilmes o que favorece sua sobrevivência durante períodos prolongados nas unidades de produção, representando, portanto, fonte potencial de contaminações para os alimentos (OLIVEIRA et al., 2010).

As espécies de *Listeria* são divididas em 15 diferentes sorotipos, baseados nos antígenos somáticos (O) e flagelares (H), 13 dos quais foram identificados em *L. monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab 4b, 4c, 4d, 4e e 7 (LUDWIG et al., 2009). Os sorotipos 4b, 1/2a e 1/2b são os responsáveis por mais de 90 % dos casos de listeriose humana. Os sorotipos 4b são isolados principalmente em surtos, enquanto os sorotipos 1/2a e 1/2b são associados a casos esporádicos (GOMES, 2014).

2.2. Listeriose

A listeriose é, reconhecidamente, um problema de saúde pública. A taxa de mortalidade chega a 70% em casos de meningite, 50% nos casos de septicemia e superior a 80% em casos de infecção neonatal (FORSYTHE, 2002; GERMANO, 2008). Acomete, sobretudo, indivíduos imunocomprometidos, grávidas, recém-nascidos e idosos, o que ressalta o oportunismo de *L. monocytogenes* e sua importância para a saúde pública (BARANCELLI et al., 2011). A listeriose tem a sua origem geralmente pela ingestão de alimentos contaminados, o que torna importante informações corretas sobre a ocorrência desta bactéria nos alimentos (VIEGAS, 2009).

As células ingeridas por meio de alimentos contaminados colonizam o trato intestinal do indivíduo vulnerável, aderem-se à mucosa e invadem o tecido, incluindo a placenta em mulheres grávidas, entram na corrente sanguínea, por onde alcançam outras células susceptíveis do corpo. *L. monocytogenes* é um patógeno intracelular, desta forma, penetra as células susceptíveis e inicia um processo de replicação dentro delas, em seguida, são fagocitadas por macrófagos, onde se multiplicam no citoplasma e espalham-se pelo organismo (JAY, 2005).

Os sintomas mais comuns são febre, dor de cabeça, fadiga, mal-estar, podendo haver ou não presença de náusea, vômito, dores e diarreia. Em casos

mais graves, ocorre meningite, meningoencefalite, encefalite e septicemia. Em casos perinatais, pode haver septicemia, morte intrauterina, nascimento prematuro e natimortos (DONELLY, 2001; LAKE et al., 2002).

A dose infectante para humanos não está bem estabelecida, devido à impossibilidade de se realizar pesquisas com voluntários saudáveis, à variação da suscetibilidade, condição imunitária do hospedeiro e à variabilidade na virulência do patógeno (BARANCELLI et al., 2011). Além disso, o tempo entre a ingestão do alimento contaminado e o aparecimento dos primeiros sintomas, assim como o diagnóstico, é muito variável, podendo levar dias até meses. Neste período, as bactérias do alimento podem ter se multiplicado, podem ter morrido ou, até mesmo, não existir mais o alimento para análise (SWAMINATHAN e GERNER-SMIDT, 2007).

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e a Organização Mundial de Saúde (FAO/WHO, 2004) sugerem que contagens inferiores a 10^2 UFC/g em alimentos não são capazes de provocar a doença, mas não excluem essa possibilidade, considerando o critério de “ausência em 25 ou 50 g” adequado como limite de tolerância para este micro-organismo em alimentos.

O CDC estima que cerca de 1.600 doenças e 260 mortes por listeriose ocorrem anualmente nos Estados Unidos (CDC, 2014a). Já na União Europeia a análise de dados demonstrou que cerca de 1.470 casos humanos foram relatados em 2011, com taxa de mortalidade de 12,7% (EFSA, 2013).

Apesar de o número de casos registrados de listeriose em todo o mundo ser alto, no Brasil não existem estatísticas oficiais sobre a ocorrência desta doença, uma vez que sua notificação não é compulsória, o que resulta na falta de dados que mostrem a magnitude do problema (DESTRO, 2006; SILVA et al., 2007; CRUZ et al., 2008; BARANCELLI et al., 2011). No Brasil, a única categoria de alimentos com padrão sanitário para *L. monocytogenes* são queijos de média, alta e muito alta umidade, para os quais a legislação estabelece tolerância zero para a bactéria em 25 g de produto (BRASIL, 1996; BRASIL, 2001).

Outros países possuem legislação mais rigorosa. O governo dos EUA, por exemplo, possui a legislação mais rígida e estabeleceu ausência de *L. monocytogenes* em 25 g de amostra em alimentos prontos para consumo e

não faz distinção entre alimentos contaminados, seja com baixos ou altos níveis de células viáveis (CHEN et al., 2003; JAY, 2005). O Canadá estabeleceu critérios para alimentos prontos para consumo de acordo com as categorias em que estes se encontram (JAY, 2005). A classificação varia de acordo com as condições que o alimento oferece para a multiplicação da bactéria, tempo de vida de prateleira e temperatura de armazenamento. Os limites legais para o número de micro-organismos permitido variam e, para cada situação, são recomendadas diferentes ações.

Alemanha considera a tolerância zero é irreal e desnecessária, sendo os alimentos classificados em categorias, semelhantes às diretivas estabelecidas pelo Canadá. Produtos que contêm contagens superiores a 10^4 UFC/g estão sujeitos a recolhimento automático (JAY, 2005).

2.3. Listeriose no Brasil

Apesar de a listeriose ser subdiagnosticada e subnotificada alguns registros comprovam a presença de *L. monocytogenes* na espécie humana provocando infecções e revelando portadores assintomáticos no Brasil. Tais registros evidenciam que os riscos de contrair esta doença são reais e que o Brasil necessita de mais estudos acerca do problema.

Em 1989, três casos de meningite bacteriana associada a *L. monocytogenes* foram diagnosticados no Instituto de Saúde do Distrito Federal (ISDF), sendo que um dos casos resultou em óbito (HOFER et al., 1998). Landgraf et al. (1999) diagnosticaram cinco casos de bebês com meningite causada por *L. monocytogenes* em um grande hospital de São Paulo, três resultaram em óbito. Em 2002, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) verificou-se a presença de *L. monocytogenes* em 50 de 148 placentas analisadas provenientes de abortos ou partos prematuros (SCHWAB e EDELWEISS, 2003). Também foram registrados casos de listeriose em pacientes que realizaram transplantes de rins (HOFER et al., 1999), idosos portadores de cirrose (TOYOSHIMA et al., 2006) e uma adolescente acometida de cirrose (DE SÁ et al., 2004).

Estudos foram realizados com o intuito de verificar quais os sorovares mais frequentemente isolados de amostras de listeriose em humanos. Hofer et al. (1984) revelaram o predomínio do sorotipo 4b (50, 70 %)

em 71 amostras de *L. monocytogenes* isoladas de processos patológicos e de portadores humanos no Brasil entre 1969 e 1983. Durante os anos de 1969 a 2000, Hofer et al. (2006) realizaram análises fenotípicas de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de 255 amostras de diferentes materiais clínicos de origem humana advindos de várias regiões do país. Foi observado que o sorovar 4b foi o mais incidente (60,3%) seguido pelo 1/2a (29%). Lemes-Marques et al. (2007) avaliaram 13 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de casos clínicos de listeriose ocorridos entre os anos de 1995 e 2005 na região sudeste do Estado de São Paulo e encontraram, também, predomínio do sorotipo 4b seguido por 1/2a.

2.4. Microbiologia e segurança das frutas e hortaliças

A demanda dos consumidores por alimentos frescos tem crescido substancialmente nas últimas décadas (RICO et al., 2007). A crescente popularidade destes produtos tem sido atribuída as suas qualidades nutricionais associadas com seus benefícios à saúde (KLAIBER et al., 2005). No entanto, apesar de preservarem melhor as características sensoriais e nutricionais, surtos de infecções e intoxicações alimentares associados a estes tipos de alimentos têm chamado a atenção para a segurança microbiológica.

Os vegetais que são consumidos *in natura* podem ser prejudiciais à saúde do consumidor. Estes alimentos são expostos a condições que favorecem a contaminação por micro-organismos, muitas vezes patogênicos (SIVAPALASINGAM et al., 2004; SANTOS et al., 2010; MCKELLAR e DELAQUIS, 2011).

As principais bactérias patogênicas de interesse em vegetais incluem *L. monocytogenes*, *E. coli* O157: H7 e *Salmonella* (KOSEKI e ISOBE, 2005). A contaminação pode ocorrer durante seu cultivo, pela irrigação, do solo ou por meio de manipuladores, equipamentos e utensílios não devidamente higienizados (SANTOS et al., 2010).

A lavagem é considerada a intervenção chave na redução da contaminação por patógenos em produtos frescos. Infelizmente, tem sido demonstrado que os processos industriais de higienização desses alimentos não garantem a total eliminação dos patógenos, quando presentes (NGUYEN-A e CARLIN, 1994; SZABO et al., 2000).

Devido à característica ubiqüitária do agente, a sua total eliminação é impossível, porém várias medidas preventivas podem ser adotadas a fim de evitar a contaminação dos alimentos.

O CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2007) estabeleceu o Guia de Aplicação de Princípios Gerais de Higiene para o Controle de *L. monocytogenes* em Alimentos. O referido guia conta com seções que abordam a produção primária, características de *layout*, fluxo dos estabelecimentos, controle das operações, manutenção e sanitização de equipamentos, higiene pessoal, transporte e a conscientização do consumidor, reforçando o fato de que o controle da bactéria envolve toda a cadeia e deve ser estendido até o consumidor.

Tais medidas só serão efetivas quando houver a ação conjunta da fiscalização, da indústria de alimentos, do produtor e dos órgãos responsáveis pela saúde pública (através da conscientização dos consumidores e notificação dos casos da doença em humanos) (D'OVÍDIO, 2014).

No Brasil muitos dos aspectos citados anteriormente são falhos. A legislação não deixa claramente estabelecidos os critérios para *L. monocytogenes*. Existe a carência de resultados de análises de produtos, uma vez que não há um programa oficial para fiscalização. Poucos são os dados clínicos que tem associação com a bactéria, já que a notificação não é compulsória. A fiscalização dos produtores apresenta limitações. Finalmente, não existem ações consistentes para a conscientização dos consumidores sobre os perigos e riscos associados aos alimentos, bem como, os cuidados a serem observados na aquisição e consumo de alimentos (MARTINS, 2009).

Estudos que avaliam os patógenos mais frequentes nas frutas são praticamente inexistentes (PENTEADO, 2003). No entanto, isto é necessário uma vez que a maior parte da produção brasileira de frutas vem de regiões que desconhecem ou não seguem a legislação para higiene e segurança dos alimentos e, por isso possuem práticas de pós colheita e comercialização pouco adequadas. A maioria das frutas é comercializada de forma precária, em comércios locais onde ficam expostos durante todo o dia, o que permite uma rápida perda de qualidade por fatores químicos, físicos e microbiológicos (PENTEADO, 2003).

A segurança dos alimentos é um aspecto importante da regulamentação governamental e da saúde dos consumidores. Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil indicaram que só no ano de 2012, ocorreram 813 surtos e 10.609 casos de doenças causadas pela ingestão de água e alimentos contaminados somente no estado de São Paulo (SVS, MS, 2014). Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil indicaram que só no ano de 2012, ocorreram 813 surtos e 10.609 casos de doenças causadas pela ingestão de água e alimentos contaminados somente no estado de São Paulo (SVS, MS, 2014).

As infecções e intoxicações de origem alimentar têm sido uma das maiores causas de doenças humanas durante séculos, apesar de se manterem subnotificadas e a sua verdadeira incidência desconhecida. Estas doenças adquiriram dimensão internacional devido não só a globalização, como também as alterações climáticas, de tecnologias de processamento de alimentos, de hábitos sociais, demográficos e econômicos (VIEGAS, 2009).

2.5. *L. monocytogenes* em frutas

O número de surtos documentados de infecções e intoxicações humanas associadas ao consumo de frutas cruas, legumes e sucos de frutas não pasteurizados tem aumentado nos últimos anos. Estes alimentos são fontes potenciais de patógenos, uma vez que são frequentemente consumidos sem processamento maior (BHARATHI et al., 2001; ANON, 2010).

Embora não se tenha dados no país de surtos envolvendo *L. monocytogenes* em frutas, sabe-se que a possibilidade de contaminação por esta bactéria é alta, já que é um micro-organismo ubíquo (GANDHI e CHIKINDAS, 2007). Além disto, as frutas geralmente possuem elevadas concentrações de açúcares e atividade de água, e por isso, depois de cortadas ou danificadas, propiciam a sobrevivência e rápida multiplicação microbiana (BEUCHAT, 1996). Surtos recentes de listeriose, principalmente nos Estados Unidos, envolvendo frutas consumidas *in natura*, reforçam a importância dos alimentos frescos como fontes potenciais desse micro-organismo.

Vahidyet al. (1992) analisaram a presença de *Listeria* spp. em 150 amostras de vegetais frescos recolhidos ao longo de um período de 12 meses em várias localidades da cidade de Karachi, no Paquistão. Foram analisadas

30 amostras de mamão, melancia e melão e 15 amostras de pepino, tomate, rabanete e cenoura. Os isolados suspeitos foram submetidos à métodos convencionais de identificação que incluem testes morfológicos, bioquímicos e sorológicos. *L. monocytogenes* foi isolada de duas amostras de mamão e tomate e uma amostra de melancia e pepino.

Macgowan et al. (1994) analisaram 822 alimentos coletados em quatro supermercados na Inglaterra e *Listeria* spp. foi isolada em 162 amostras de frutas.

Sado et al. (1998) utilizaram kits rápidos para verificar a incidência de *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, coliformes e coliformes termotolerantes em 50 amostras de sucos vendidos a varejo. *L. monocytogenes* foi isolada de duas amostras de suco não pasteurizados, um suco de maçã e um suco de maçã com framboesa.

Uchima et al. (2008) avaliaram a incidência de *L. monocytogenes* em caqui durante um período de 5 meses (de março a julho) de dois períodos de estações (anos 2005 e 2006). Os frutos foram coletados em mercados de atacado e varejo nas ruas das cidades de São Paulo e Campinas, Brasil. Um total de 582 frutos foram analisados, mas o levantamento da incidência mostrou a ausência de *L. monocytogenes*.

Penteado e Leitão (2009) analisaram a presença de *Listeria* spp. em 120 amostras de fruta (melão, melancia e mamão) utilizando um método imunoenzimático (TECRA VIA). Nenhuma cepa de *L. monocytogenes* foi encontrada, no entanto, *L. innocua* e *L. grayii* foram isoladas a partir de três amostras de melancia, *L. ivanovii* em cinco amostras de mamão e *L. welshimeri* em uma amostra de melão, quando utilizado o método canadense "Health Protection Branch". Observou-se que as amostras coletadas em feiras livres mostraram uma maior contaminação por *Listeria* spp. quando comparadas com aquelas obtidas em centrais de abastecimento (CEASA) (PENTEADO e LEITÃO, 2009).

Sabe-se que as frutas são potenciais fontes de *L. monocytogenes* e representam grande risco de doença ao consumidor, uma vez que, com frequência, são consumidas na forma *in natura*. No entanto, são escassas as pesquisas que avaliem a incidência desse patógeno nesses alimentos. Atualmente não existem estudos na literatura sobre a incidência de *L.*

monocytogenes em jabuticaba e poucos sobre sua incidência em melão, entretanto, sabe-se que tais estudos são relevantes.

2.6. Jabuticaba: origem, cultivo, produtividade e comercialização

Além das frutíferas tradicionais, de grande impacto econômico, muitas são nativas e ainda não totalmente exploradas comercialmente no Brasil. No entanto, o país possui uma das maiores áreas cultiváveis do planeta, é privilegiado pela biodiversidade de sua flora, além de uma ampla variedade de solos e climas que permitem a exploração de quase todas as espécies (DAL RI, 2006).

A jabuticabeira é uma das frutíferas que tem despertado grande interesse entre os produtores rurais devido a sua alta produtividade, rusticidade e aproveitamento de seus frutos nas mais diversas formas (BRUNINI et al., 2004). A utilização da jabuticaba está baseada nas características alimentícias, medicinais e ornamentais, destacando sua utilização na alimentação humana (GUEDES, 2009).

O estímulo à produção vem crescendo consideravelmente. No Brasil seu consumo aumenta a cada ano e outros países da América do Sul também cultivam a jabuticaba, como Argentina e Uruguai (FIOCRUZ, 2013).

A jabuticabeira é uma fruta exótica originária do centro-sul, pertencente à família *Myrtaceae*, de ocorrência espontânea em grande parte do país (LIMA et al., 2008, CITADIN et al., 2010). Dentre as espécies conhecidas destacam-se a *Myrciaria cauliflora* (DC) Berg (jabuticaba-açu-paulista) e a *Myrciaria jabuticaba* (Vell) Berg (jabuticaba-sabará) que produzem frutos apropriados tanto para a indústria como para consumo *in natura* (BRUNINI et al., 2004; CITADIN et al. 2010; BORGES et al., 2011).

A jabuticaba-sabará é a mais cultivada no Brasil e apresenta frutos classificados como bacilo globoso, com 20 a 30 mm de diâmetro e polpa macia, esbranquiçada, suculenta e de sabor levemente ácido, apresentando de uma a quatro sementes (BRUNINI et al., 2004; LIMA et al., 2008). Essa espécie se destaca na preferência popular devido à doçura dos frutos o que viabiliza o consumo *in natura*, sendo comum encontrá-la nos quintais como cultura doméstica e não comercial (CITADIN et al., 2010; BORGES et al., 2011). Trata-se de uma planta resistente às pragas e que pode frutificar mais de uma vez ao

ano, no período da primavera e verão, se cultivada em solo com suprimento regular de água (BORGES et al., 2011)

A jabuticabeira pode ser encontrada em grande parte do país, desde o estado do Pará até o Rio Grande do Sul, mas é nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo que ocorrem maiores produções (LIMA, 2002; BRUNINI et al., 2004). A produção cresce a cada ano e a estimativa de produção de jabuticaba no ano de 2013, do Instituto de Economia Agrícola, foi um recorde, aproximadamente 2,7 mil toneladas da fruta só no estado de São Paulo (RURALBR, 2013).

Durante a safra, os frutos são comercializados em feiras livres e mercados municipais, geralmente expostos em condições precárias, armazenados em caixa de papelão, madeiras ou latas, mantidos sob temperatura ambiente e comumente sem tratamento pós-colheita. Nessas condições, a maioria dos frutos perde o valor comercial no período de 2 a 3 dias (LIMA, 2002; CITADIN et al., 2010). O uso de refrigeração, quando bem aplicado, é ainda um dos meios mais eficazes na manutenção da qualidade e extensão do período de comercialização desses frutos (BRUNINI, 2004).

O curto prazo e a facilidade em que ocorre a deterioração da jabuticaba prejudica o uso industrial dessa fruta, sendo assim, o consumo mais comum da jabuticaba é *in natura* (OLIVEIRA et al., 2003; CITADIN et al., 2010). Estes fatos ressaltam a importância de apurar as condições microbiológicas desses frutos que são, em sua maioria, consumidos sem tratamento prévio.

2.7. Melão: origem, cultivo, produtividade e comercialização

A diversidade de frutas tropicais no mercado é crescente e a demanda apresenta tendência de crescimento devido à publicação de pesquisas associando o consumo de frutas com benefícios a saúde humana. Dentre estas, o melão possui grande destaque e importância econômica no agronegócio brasileiro, sua demanda interna tende a crescer e atualmente é a fruta mais exportada do Brasil (IBRAF, 2013).

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma olerícula pertencente à família *Cucurbitaceae*, cujo centro de origem é a África, entretanto, foi a partir da Índia que ocorreu sua dispersão. Atualmente é possível encontrar o melão em diversas regiões do mundo, desde os países mediterrâneos, centro e leste da

Ásia, sul e centro da América como, também, no centro e sul da África (TODA FRUTA, 2013).

Os frutos de melão podem apresentar grande variação no peso, mas possuem em média 1,5 kg a 2 kg (EMBRAPA, 2014a).

O Brasil se destaca como um dos maiores produtores de melão na América do sul e atualmente é responsável por, aproximadamente, 17 % da produção mundial. Ocupa a 19ª colocação mundial com fortes tendências de crescimento na produção devido ao aumento do consumo interno e das exportações. Além disso, o Brasil possui tecnologia e conhecimentos que dão suporte para expandir a produção e abastecer o mercado interno e aumentar as exportações (TODA FRUTA, 2013).

A região nordeste é a principal produtora de melão do Brasil e contribui com mais de 90 % da produção brasileira. Apresenta bons rendimentos, principalmente nos estados da Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Ceará (SEBRAE 2013; EMBRAPA, 2014b). A atuação de grandes empresas, que destinam boa parte da sua produção para exportação, é responsável pela expansão da cultura na região. As condições climáticas favorecem o cultivo nesta região onde os frutos têm melhor sabor, maior teor de açúcares e podem ser cultivados o ano inteiro (SEBRAE, 2013).

Existem nove variedades botânicas de melão. No Brasil, cultivam-se híbridos e cultivares comerciais pertencentes a duas variedades: *Cucumis melo var.inodorus* e *Cucumis melo var.cantalupensis*. Os melões mais conhecidos e apreciados pertencem ao grupo *inodorus*, tipo amarelo. A cultivar Valenciano e suas seleções Amarelo, Amarelo CAC e Eldorado 300 são as mais cultivadas (SEBRAE, 2013). Os frutos do melão amarelo são arredondados, possuem casca amarela e enrugada e polpa com coloração esverdeada a creme. A casca confere a este fruto grande resistência ao transporte e armazenamento e uma longa conservação pós-colheita (CEAGESP, 2002).

Os melões são frutos muito consumidos na forma “*in natura*”, em saladas e/ou minimamente processados o que torna esta fruta uma possível fonte de patógenos.

A contaminação do melão pode ser proveniente de varias fontes, tais como: solo, répteis, insetos, água poluída com material fecal, fertilizantes

orgânicos não tratados, equipamentos de colheita e manipuladores (EMBRAPA, 2014b).

O crescimento de bactérias patogênicas é improvável na maioria das frutas, no entanto o melão é uma das exceções por causa de seu pH próximo a neutralidade, em torno de 6,5 (FOODSAFETY, 2002). Micro-organismos patogênicos como *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Clostridium botulinum* e *Escherichia coli* são os patógenos mais associados com a agricultura constituindo perigos potenciais na cultura do melão. Em particular, *L. monocytogenes* representa grande risco devido a sua grande distribuição no ambiente e, principalmente, por possuir capacidade de sobreviver por longos períodos de tempo, no solo ou em material vegetal, em condições adversas (EMBRAPA, 2014b).

Os melões podem ser submetidos à refrigeração para extensão da vida útil, que pode chegar até duas semanas (BRAZILIAN FRUIT, 2014), no entanto, micro-organismos como *L. monocytogenes* multiplicam-se em baixas temperaturas e podem atingir número elevado antes do produto apresentar características sensoriais inadequadas. Sabe-se que técnicas de limpeza e sanitização adequadas podem reduzir a contaminação inicial e garantir a segurança microbiológica do produto, no entanto, ainda são pouco empregadas antes do consumo.

2.8. Métodos de detecção de *Listeria* spp.

De modo geral, as espécies do gênero *Listeria* multiplicam-se em quase todos os meios bacteriológicos não seletivos, no entanto, quando estas bactérias estão presentes em pequenas quantidades a sua detecção pode ser dificultada. Desta forma, a análise microbiológica convencional se baseia na realização de etapas de enriquecimento, para recuperação de células injuriadas, seguida de semeadura em placas contendo meios seletivos para o isolamento de *Listeria* a partir de amostras, como os alimentos. Após o isolamento nos meios de cultura seletivos as colônias suspeitas, típicas do gênero, são submetidas a testes de confirmação, como provas morfológicas, bioquímicas e sorológicas (DONNELLY e RYSER, 2001; BRASIL, 2003, SILVA et al., 2007).

Embora confiáveis e considerados oficiais, os métodos convencionais de detecção podem ser afetados por fatores ambientais e variações na expressão gênica o que afeta o poder discriminatório das análises. Além disso, apesar de um resultado negativo poder ser confirmado em 3 ou 4 dias, o tempo para um resultado positivo é geralmente de 5 a 7 dias após coleta da amostra (PAOLI et al., 2005). Como nem sempre é possível armazenar os alimentos durante 7 dias antes da distribuição, a indústria de alimentos busca métodos mais rápidos para a detecção de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*.

Neste contexto, técnicas alternativas, confiáveis, rápidas e de alto poder discriminatório, como métodos imunanalíticos e genotípicos vem sendo amplamente utilizadas para detecção de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*. Essas técnicas alternativas apresentam grande confiabilidade quando comparadas com o método convencional e apesar de exigirem etapas de enriquecimento antes das análises, para recuperação das células injuriadas, são mais rápidas e permitem que o teste possa ser concluído em 48 h.

Uma abordagem geral dos métodos de detecção de *L. monocytogenes* em alimentos é apresentada na Figura 1.

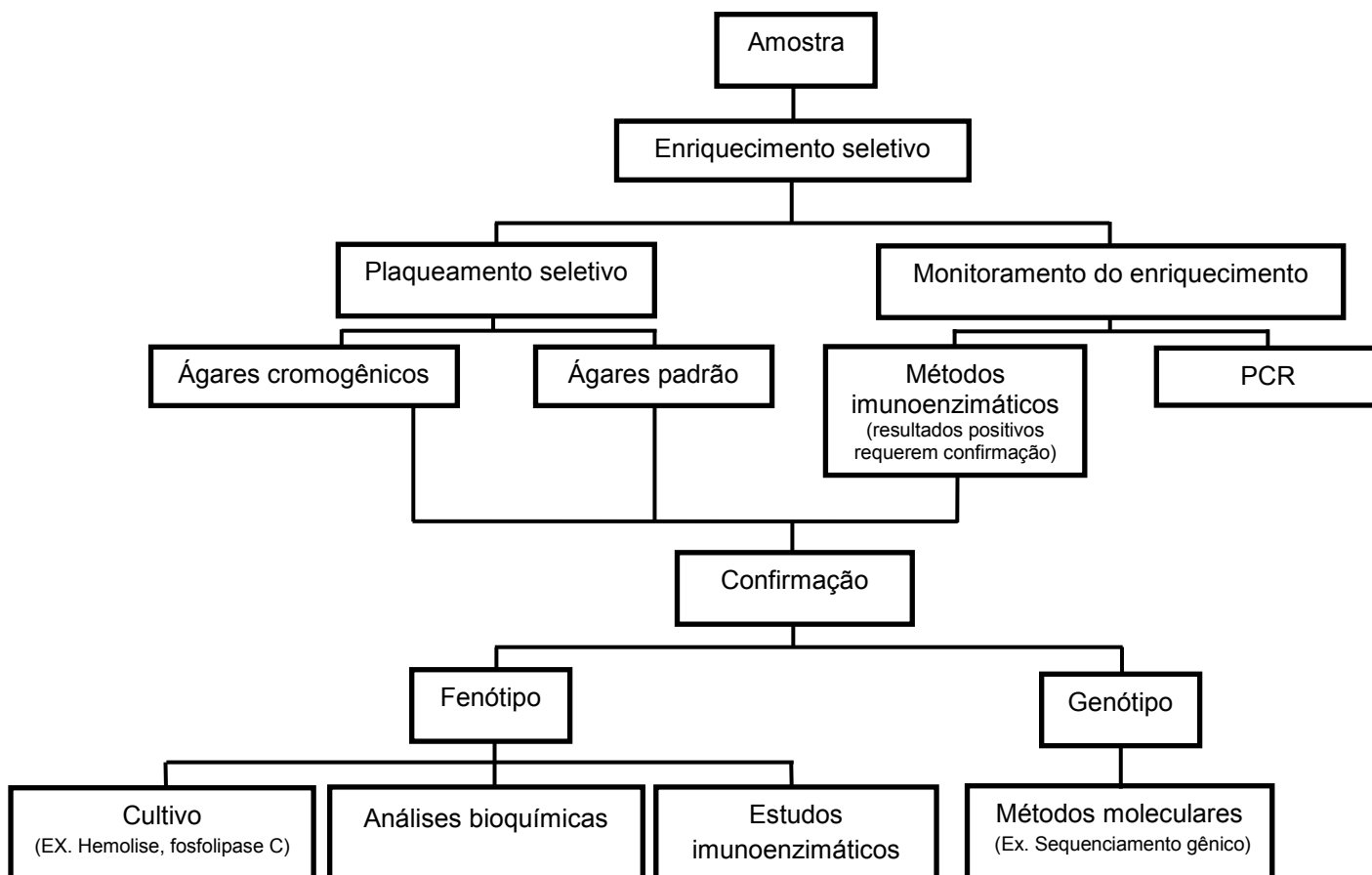


Figura 1- Métodos de detecção de *L. monocytogenes* em alimentos.
Adaptado de Gasanovet al. (2005).

2.8.1. Reação de polimerase em cadeia (PCR)

Desenvolvida primeiramente por Kary B. Mullis em 1985 a Reação de Polimerase em Cadeia permite obter milhões de cópias de um segmento específico de DNA utilizando a enzima TaqDNA polimerase. Esta enzima sintetiza uma sequência complementar de DNA desde que um pequeno fragmento (oligonucleotídeo) já se encontre ligado à cadeia do DNA no ponto escolhido para o início da síntese. Os oligonucleotídeos ou iniciadores definem a sequência a ser replicada e o resultado obtido é a amplificação de uma determinada sequência com bilhões de cópias (MULLIS, 1990). A reação é realizada em equipamento automatizado, denominado termociclador, que promove a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, provocando a desnaturação e síntese do DNA em ciclos repetitivos. A visualização dos produtos da amplificação é realizada por meio de eletroforese em gel de agarose.

Por ser um método genotípico, a PCR permite a análise da genética microbiana, minimizando assim as desvantagens advindas dos métodos fenotípicos, que podem ser afetados por fatores ambientais e consequentes variações na expressão gênica (OLIVE e BEAN, 1999). Além disso, esta técnica detecta quantidades muito baixas de DNA pela amplificação de sequências que são únicas no micro-organismo alvo, o que possibilita a detecção de concentrações muito baixas de micro-organismos patógenos. Para a identificação do micro-organismo alvo, geralmente são utilizados genes que codificam o rRNA, fatores de virulência ou genes envolvidos no metabolismo celular.

A PCR é uma técnica que apresenta alto poder discriminatório e que fornece resultados confiáveis e rápidos, facilitando a separação de um grande número de cepas (GRAVES et al., 2007).

2.8.2. Método imunoenzimático

O princípio de detecção de micro-organismos por meio de imun análise baseia-se na interação entre antígenos e anticorpos (THOMASON, 1971; DUFFEY et al., 1992). Entre as técnicas imunológicas, as imunoenzimáticas se destacam, uma vez que utilizam anticorpos policlonais ou monoclonais marcados com enzima cromogênica (REIS et al., 2001).

A maior especificidade da imun análise é dada em função do tipo de reação realizada que pode ser do tipo sanduíche direto, sanduíche indireto, competição e imunocaptura, dependendo da pesquisa efetuada (Manual do *kit* VIDAS® Bio-mérieux, 2007). Os antígenos pesquisados podem ser os somáticos (O), capsulares (Vi) ou flagelares (H). No caso de *L. monocytogenes* os antígenos pesquisados são os somáticos e flagelares (ROBIN et al., 2006; SILVA et al., 2007).

Um exemplo de método imunoenzimático de confiança é o sistema qualitativo de reações imunoenzimáticas, o VIDAS® (Bio - Merieux) que utiliza uma mistura de anticorpos monoclonais de captura de grande afinidade e permite a detecção de antígenos de virulência pela técnica ELFA (Ensaio com enzima ligada a composto fluorescente) (KERDAHI e ISTAFANOS, 2000; VAZ - VELHO et al., 2000). A reação tipo sanduíche entre o anticorpo ligado ao antígeno confirma a presença do micro-organismo. O anticorpo é marcado com

a enzima fosfatase alcalina que hidrolisa o substrato 4-metil umbeliferil fosfato presente no meio que se transforma em umbeliferona emitindo fluorescência a 450 nm quando excitado a 370 nm. O teste possui elevada sensibilidade visto que a mínima formação do hidrolisado produz sinais de fluorescência detectáveis (MANUAL DO KIT VIDAS® Biolab-Mérieux, 2007).

O teste comercial, o VIDAS ® ensaio LMO (Bio-Mérieux) apresenta grande sucesso na detecção de *L. monocytogenes*. É um ensaio qualitativo, mas, quanto maior for a quantidade de antígeno, maior é a intensidade da fluorescência capturada (JANZTEN, 2006).

2.8.3. Sequenciamento gênico

A demanda por um método que permitisse desvendar a informação codificada no genoma humano impulsionou a evolução das técnicas de sequenciamento. O sequenciamento de DNA é uma série de métodos bioquímicos que têm como finalidade determinar a ordem das bases nitrogenadas adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T) da molécula de DNA, seja de um único gene ou do genoma completo de um organismo (PREVET, 2013).

As sequências de DNA são "lidas" por equipamentos de sequenciamento automático, capazes de ler até 1000 nucleotídeos ou bases de uma só vez. Então, um algoritmo de montagem de genoma é utilizado para reunir todas as partes e colocá-las na ordem original, detectando todos os locais onde existem coincidências entre fragmentos distintos de DNA. As partes coincidentes podem ser fundidas, unindo duas sequências de DNA. O processo é repetido até montar a sequência completa (DARNELL et al., 1990).

A tecnologia de sequenciamento foi descrita pela primeira vez por Sanger em 1977 como um método para a determinação de sequências de nucleotídeos (SANGER et al., 1977). O método de Sanger é atualmente o mais empregado e consiste na síntese enzimática de uma fita complementar de DNA, cujo crescimento é interrompido pela adição de nucleotídeos modificados, chamados didesoxiribonucleotídeos.

O sequenciamento pelo método *dideoxy* ou método do término do crescimento da cadeia, desenvolvido por Sanger, foi a base para o atual sequenciamento de terceira geração que proporcionou uma

acentuada evolução tecnológica marcada por um elevado rendimento num curto espaço de tempo, além de custos reduzidos (MORENO, 2013).

2.8.4. Sorotipagem

Os métodos de detecção apresentados anteriormente não diferenciam os sorotipos de *L. monocytogenes* presentes (DIAS, 2008). Deste modo para determinação do sorotipo das cepas isoladas é necessário a utilização de uma técnica de sorotipagem.

A sorotipagem é uma técnica fenotípica, ou seja, diferencia as cepas por meio da caracterização dos produtos da expressão gênica (TENOVER et al., 1997). É uma das técnicas mais tradicionais utilizada para promover a diferenciação de cepas de patógenos de origem alimentar e baseia-se na reação antígeno-anticorpo. Nesta técnica anticorpos específicos são utilizados para identificar antígenos homólogos do micro-organismo (WIEDMANN, 2002). Esta metodologia baseia-se na variação dos antígenos somáticos (O) e flagelares (H) presentes na bactéria.

A sorotipagem de *L. monocytogenes* é importante para a caracterização e correlação entre os principais sorotipos envolvidos em casos/surtos de listeriose. Dos 13 sorovares de *L. monocytogenes* capazes de causar doença, 90% dos casos de listeriose humana são causados pelos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b, sendo este último responsável pela maioria (GELLIN e BROOME, 1989; SWAMINATHAN, 2001).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostragem

Cada amostragem de melão constituiu uma unidade da fruta, com peso de aproximadamente 1,5 a 2 kg. Já para a jabuticaba, cada unidade amostral foi composta pela quantidade de jabuticabas necessárias para se atingir o peso de 250 g. As frutas maduras foram adquiridas em centros de venda (supermercados, minimercados e feiras) ou coletadas diretamente das plantas, na cidade de Viçosa-MG. Essas amostras foram coletadas em sacos plásticos esterilizados e enviadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Higiene Industrial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (DTA/UFV).

Para o cálculo do tamanho da amostra, para amostragem aleatória simples por meio de estudo de prevalência, utilizou-se a fórmula descrita abaixo (MUNIZ e ABREU, 1999):

$$n = Z^2 \cdot P \cdot (1-P) / (D^2) \quad (1)$$

Onde:

n= Tamanho da amostra

Z= Valor da distribuição normal padrão correspondente ao nível de confiança desejado (Z= 1,96 para Intervalo de Confiança de 95%)

P= Prevalência esperada

D= Erro máximo aceitável na estimativa

Como base de cálculo para a estimativa do valor de prevalência foram utilizados alguns estudos encontrados na literatura que avaliaram a incidência de *L. monocytogenes* em frutas e produtos de frutas. Com base nestes estudos foi observado que as frutas ou produtos de frutas contaminados corresponderam a aproximadamente 2% da população amostral. Assim, para o valor de P, tomou-se como base uma prevalência estimada de 2%. O valor do erro admitido (D) foi definido como igual a 5% e o de Z como 1,96 (para $\alpha = 0,05$ e IC = 95%). O tamanho mínimo calculado para a amostra foi de 30 unidades amostrais.

Foi possível coletar e analisar um total de 150 unidades amostrais de melão e 60 unidades amostrais de jabuticaba. Tais amostras foram analisadas quanto à presença de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*.

3.2. Avaliação da incidência de *Listeria* spp. pela metodologia convencional

Após a chegada ao laboratório, as amostras foram lavadas sob condições assépticas utilizando-se água esterilizada em volume aproximado ao peso da unidade amostral, pois acredita-se que a contaminação por *Listeria* seja superficial. A solução de lavagem foi posteriormente filtrada em membrana de 0,45 µm. Seguindo a metodologia oficial da ISO 11290-1 para a detecção de *Listeria* spp., o sedimento retido na membrana foi diluído em 25 mL de caldo Half-Fraser (HF) sem a adição dos agentes seletivos, seguindo-se incubação a 20±2°C/1h para recuperação de células injuriadas. Após este período, o caldo HF foi adicionado do suplemento seletivo Half Fraser (citrato de ferro amoniacal, ácido nalidíxico e acriflavina) e incubado por 24h a 30°C. Posteriormente, 1 mL do caldo HF foi transferido para tubos de caldo Fraser (FR), incubando-se a 30±1°C/24±3h.

Alíquotas do caldo FR foram transferidas por estrias para placas de Ágar Palcam (PAL) e Ágar Oxford (OX), com incubação a 37±1 °C/ 24±3h. Após a incubação, as colônias presuntivas de *Listeria* spp. com 2 a 3 mm de diâmetro e com halos castanhos ou negros, devido à hidrólise da esculina, foram estriadas em placas contendo Ágar Tripton de Soja com Extrato de Levedura a 0,6% (TSA-YE 0,6%) e incubadas a 37±1°C/24±3h.

Apesar de haver agentes seletivos presentes nos meios utilizados para o isolamento e identificação de *Listeria* spp., outros organismos podem crescer e alguns deles podem apresentar uma morfologia da colônia semelhante. Dessa forma, as colônias suspeitas devem ser investigadas quanto às características típicas do gênero (RYSER e MARTH, 2004). Os isolados presuntivos foram então submetidas aos seguintes testes bioquímicos para identificação de *Listeria* spp.: coloração de Gram, catalase e motilidade.

Para o teste de coloração de Gram utilizou-se colônias previamente cultivadas em placas contendo TSA-YE 0,6 e incubadas a 37 ± 1 °C/24 ± 3 h.

Para a realização do teste de catalase, uma colônia foi colocada sobre uma lâmina de vidro. Em seguida, adicionou-se uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%, homogeneizando-se a colônia. O teste é positivo quando se observa a formação de bolhas de ar (GANDHI e CHIKINDAS, 2007).

Para a prova de motilidade utilizou-se o meio Sulfeto-Indol-Motilidade (SIM). Com auxílio de uma agulha o meio foi inoculado até dois terços com uma colônia isolada da bactéria e incubado a 25°C, por um período de até 7 dias. A motilidade é positiva quando o meio apresenta motilidade típica de *Listeria*, ou seja, aspecto de “guarda-chuva” no terço superior do ágar (HOLT et al., 1994).

3.3. Avaliação da incidência de *L.monocytogenes* pelo método imunoenzimático

Todas as amostras de melão e jabuticaba foram avaliadas pelo método rápido de detecção imunoenzimático VIDAS[®]-LMO quanto à presença de *L. monocytogenes*.

Foram analisadas nove amostras por vez. Sendo assim, recolheu-se 0,5 mL do caldo de enriquecimento secundário de cada amostra, o volume total de 4,5 mL recolhido foi centrifugado a 5.000 rpm/ 15 min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em água destilada até volume de 0,5 mL. Este volume final foi aquecido a 95-100°C/ 1-2 min e analisado no imunoenalisador Mini-VIDAS[®] pelo *Kit* VIDAS[®]-LMO quanto à presença de *L. monocytogenes*.

3.4. Identificação genética dos isolados bacterianos

Os isolados de *Listeria* spp. suspeitos obtidos pelo método convencional foram analisados por meio de técnica de PCR e sequenciamento genético. Para a realização dessas análises foi feita extração de DNA dos isolados.

3.4.1. Extração de DNA das amostras

Para extração do DNA, as cepas foram ativadas em caldo BHI a 37 °C/24 h. Após ativação, 1 mL do caldo de crescimento de cada cultura foi transferido para tubos eppendorf de 1,5 mL para extração de DNA. O DNA genômico das estirpes bacterianas foi extraído utilizando o *kit* Promega

(WizardGenomic, DNA PurificationKit) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram mantidas a, aproximadamente,-20°C até o momento do uso.

3.4.2. Amplificação de genes específicos de *L. monocytogenes*

As sequências dos oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1- Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para identificação de *L. monocytogenes*

Espécie	Gene	Oligonucleotídeo	Sequencias (5'-3')	Produto de PCR (pb)	Concentração (µm)	Referência
<i>L. monocytogenes</i>	<i>lmo1030</i>	lmo1030-F	GCTTGTATTCACTTGGATTGTCTGG	509	0.56	Ryuet al., 2013
		lmo1030-R	ACCATCCGCATATCTCAGCCAACT			

Utilizou-se um total de 25 µL de mistura de PCR que consistiu de reagente 10x BufferGreenadicionado de MgCl₂ (Promega®, Estados Unidos),uma misturade dNTP a 10 mM(dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Promega®, Estados Unidos), um par de cada oligonucleotídeo, com diferentes concentrações para cada reação, 25 ng de uma mistura de DNA molde, 0,2µLdeTaq polimerasea 5 U/µL. O volume foi completado com água ultrapura esterilizada, livre de DNase e RNase.

Como controle positivo,foi utilizadauma cepa de referência de *L. monocytogenes*(ATCC 7644). Como controle negativo, utilizou-se uma cepa ATCC de *Bacillussubtilis*.Outro controle consistiu da mistura dos reagentes substituindo o lisado de células por água ultrapura esterilizada.

A PCR foi realizada com uma desnaturação inicial a 94 °C durante 5 min, 35 ciclos de desnaturação a 94 °Cdurante 30 s, hibridação a 60 °C durante 30s, extensão a 72 ° C durante 30 s e extensão final de 72°C durante 5 min (RYUet al., 2013).

Amplicons obtidos no PCR foram submetidos a eletroforese sobre um gel de agarose a 3,0% (p/v), utilizando um tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) corado comGelRedNucleicAcid Gel Stain (Promega®, Estados Unidos), em

uma diferença potencial de 80V. Foi usado um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100pb(Promega®, Estados Unidos) para estimativa do tamanho dos produtos de PCR. Para visualizar o resultado o gel foi exposto à luz ultravioleta em um transluminador.

3.4.3. Sequenciamento gênico dos isolados obtidos

A obtenção do fragmento de DNA a ser purificado e sequenciado foi feita por meio da amplificação de parte do gene 16S rDNA utilizando o par de oligonucleotídeos universais 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') e P027 (5' GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3'), os quais dão origem a fragmentos com cerca de 1500 pb. As reações de amplificação foram realizadas em microtubos em um volume final de 50 µL contendo: 2µL de DNA, 5 µL do reagente 5x BufferGreen(Promega®, Estados Unidos) 1,4 µL de uma mistura de dNTP a 10mM (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Promega®, Estados Unidos) 0,4 µL de Taq Polimerase a 5 U/µL (Promega®, Estados Unidos), 1µL MgCl₂ a 25mM, e 1 µL de cada oligonucleotídeo (concentração final de 0,1 Mm). O restante do volume foi completado com água ultrapurificada esterilizada.

A reação de PCR foi realizada em termocicladorAxygenmaxygene (CLP, Estados Unidos). As condições de amplificação seguiram o seguinte protocolo: 4 min de desnaturação a 94 °C; 35 ciclos de amplificação a 94 °C por 30 s; anelamento a 63 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1,5 min e 72 °C por 7 min. Os fragmentos gerados foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), em tampão TAE 0,5x, corados com GelRed(Promega®, Estados Unidos) e visualizados sob luz ultra-violeta. Os produtos da PCR foram enviados para sequenciamento na empresa Macrogen Inc. (Coréia do Sul).

As sequências bidirecionais obtidas foram comparadas a sua fita complementar gerando uma fita consenso pelo *software* DNA Baser 3.5.4 (<http://www.dnabaser.com/index.html>). A sequência obtida de cada isolado foi submetida à análise comparativa com sequências depositadas no banco de dados GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) do *National Center for BiotechnologyInformation*(NCBI) e alinhadas utilizando o *software* BLAST, disponível pela rede mundial de computadores. Admitiu-se concordância de no mínimo 95% para confirmação da especificidade da sequência.

3.5. Sorotipagem

As cepas de *L. monocytogenes* foram enviadas à seção de bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz) para sorotipagem utilizando-se os soros O e H.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Avaliação da incidência de *Listeria*spp. pela metodologia convencional

A partir do método oficial da ISO 11290-1 para recuperação de *Listeria*spp. foi possível obter 21 isolados suspeitos de pertencerem ao gênero *Listeria*, todos provenientes dos frutos de melão (Tabela 2).

Tabela 2- Distribuição da frequência de ocorrência de *Listeria* spp. em amostras de melão e jabuticaba pelo método de análise convencional

Fruta	Ausente	<i>Listeria</i> spp.	Total de amostras avaliadas
Melão	129 (86%)	21 (14%)	150
Jabuticaba	60 (100%)	0 (0%)	60
Total	189 (90%)	21 (10%)	210

Todos esses isolados apresentaram resultados positivos nos testes de produção de catalase, além de apresentarem colônias com características típicas do gênero *Listeria*. Dentre estes, apesar de somente 16 apresentarem-se como bastonetes gram-positivos, móveis e com crescimento característico em formato de guarda-chuva, quando incubados em meio SIM na temperatura de 25°C, todos foram agrupados como suspeitos de pertencerem ao gênero *Listeria*, devido aos problemas que os testes fenotípicos podem apresentar, levando a resultados falsos negativos.

Embora confiáveis e considerados oficiais, os métodos convencionais de detecção, podem ser afetados por fatores ambientais, que geram variações na expressão gênica, dessa forma os isolados, obtidos pelo método oficial da ISO 11290-1, foram posteriormente submetidos ao sequenciamento da região amplificada do gene 16S rDNA, com o objetivo de identificar e agrupar filogeneticamente os isolados obtidos, além de confirmar o número de isolados realmente pertencentes ao gênero *Listeria*.

4.2. Avaliação da incidência de *L. monocytogenes* pela metodologia imunoenzimática

A incidência de *L. monocytogenes* foi avaliada por meio do teste rápido de detecção imunoenzimático VIDAS®-LMO. De acordo com os resultados obtidos nenhuma das amostras analisadas pela metodologia convencional, apresentou resultado positivo para a presença de *L. monocytogenes*.

Apesar do método imunoenzimático ter indicado ausência do patógeno, em presença de muitos isolados suspeitos obtidos pela metodologia oficial, cabe ressaltar que a metodologia convencional foi empregada com o objetivo de recuperar células de *Listeria* spp. e nem sempre uma amostra positiva para *Listeria* sp. está necessariamente contaminada por *L. monocytogenes*.

Alguns autores compararam a metodologia oficial com o método rápido de análise utilizando o *kit* mini-VIDAS e concluíram que a técnica imunoenzimática possui elevada sensibilidade, especificidade e eficácia, podendo ser empregada em substituição às análises convencionais para a triagem de amostras. Dentre eles, Vaz-Velho et al. (2000) avaliaram, comparativamente, a metodologia mini-VIDAS®-LMO e a técnica convencional na pesquisa de *L. monocytogenes* e encontraram 96 % de especificidade e 73 % de sensibilidade para o método rápido. Além disso, concluíram que a técnica imunológica possui algumas vantagens em relação à técnica convencional como maior rapidez e especificidade e sensibilidade comparáveis. Já Benetti et al. (2013) avaliaram, comparativamente, as duas metodologias na pesquisa de *Listeria* spp. e encontraram, para o teste rápido, sensibilidade e especificidade de 96,7% e 94,70%, respectivamente.

Os dados de análise comparativa entre os métodos mini-VIDAS e o da ISO 11290-1 apresentados em tais estudos indicam que ambos os métodos são similares e eficazes na detecção de *Listeria* sp.

4.3. Identificação genética dos isolados

4.3.1. Amplificação de genes específicos de *L. monocytogenes*

Os 21 isolados suspeitos de pertencerem ao gênero *Listeria* obtidos pelo método oficial de recuperação de *Listeria* spp. foram testados quanto a presença de *L. monocytogenes* e *L. innocua* por meio de análise de PCR.

Os produtos da PCR visualizados por separação eletroforética em gel de agarose para detecção de *L. monocytogenes* estão apresentados na figura 2. A análise foi realizada em triplicata para avaliar a reprodutibilidade e consistência dos resultados.

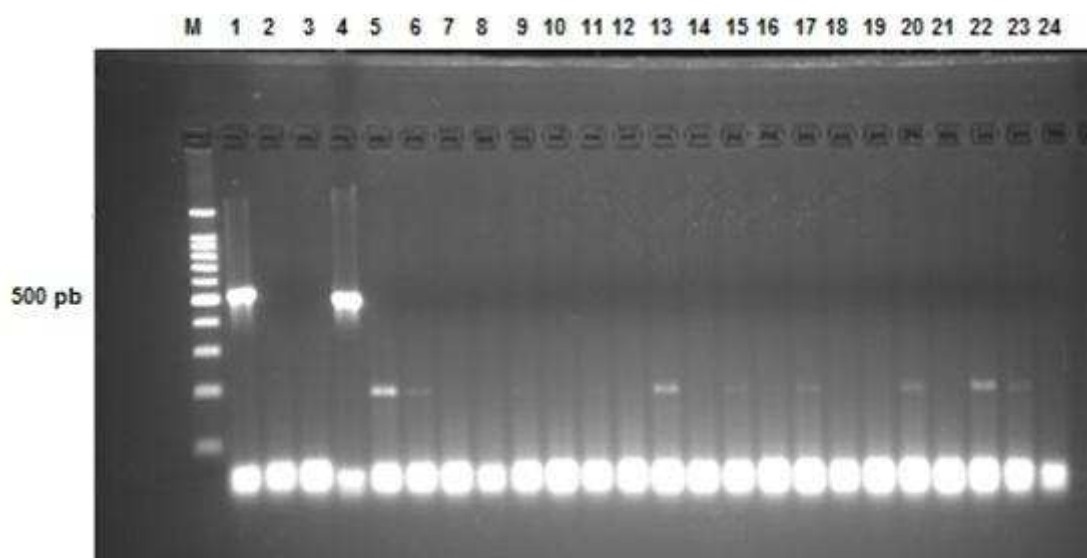


Figura 2- Visualização do produto de PCR para identificação de *L. monocytogenes*.

M: Marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pb, canaleta 1: Controle positivo utilizando uma cepa de *L. monocytogenes* (ATCC 7644), canaleta 2: Controle negativo (cepa de *Bacillus subtilis*), canaleta 3: Controle (mistura dos reagentes substituindo o lisado de células por água ultrapura esterilizada), canaletas 4 a 24: amostras dos 21 isolados suspeitos.

O par de iniciadores utilizado apresentou elevada especificidade com a estirpe utilizada como controle positivo (canaleta 1), produzindo amplicons de PCR de tamanho esperado (509 pb). As sequências dos iniciadores utilizados estão apresentados na Tabela 1.

A eletroforese em gel confirmou que o par de iniciadores foi específico, ampliando somente os produtos de PCR desejados. Isto implica que o

oligonucleotídeo utilizado é específico para a detecção da espécie *L. monocytogenes* e não gera resultados falsos positivos.

A canaleta quatro apresentou uma banda que consistiu de amplicon específico de *L. monocytogenes* (509 pb). Desta forma, dentre os 21 isolados, uma estirpe de *L. monocytogenes* foi encontrada por meio da reação de PCR. Este resultado diferiu daquele obtido pelo teste imunológico, utilizando o *kit* VIDAS®-LMO, que indicou ausência de *L. monocytogenes* em todas as amostras de frutas analisadas.

Sabe-se que tanto o método imunoenzimático, utilizando o *kit* mini-VIDAS, quanto a técnica de PCR são excelentes métodos de detecção de *Listeria* sp. e podem ser empregados para triagem de amostras (MORO et al., 2007). No entanto, por apresentar limite de detecção inferior à técnica de imunoenálise, a PCR é um método mais sensível (MORO et al., 2007). Neste sentido, é possível que o nível de recuperação das células de *L. monocytogenes*, obtido pelas etapas de enriquecimento, tenha sido suficiente para possibilitar a detecção pela técnica de PCR e insuficiente para possibilitar a detecção pelo método imunoenzimático. Uma recuperação insuficiente de células de *L. monocytogenes* nos caldos de enriquecimento pode ocorrer devido à presença de outras espécies do gênero *Listeria*, que são capazes de se multiplicar nos meios de enriquecimento seletivo, levando a repressão do crescimento do patógeno, reduzindo sua recuperação e impedindo sua detecção.

De acordo com os resultados obtidos, a taxa de falsos-negativos, estimada para o teste imunológico, foi de 5% (1/20). Vaz-Velho et al. (2000), que avaliaram comparativamente a metodologia mini-VIDAS®-LMO e a convencional na pesquisa de *L. monocytogenes*, encontraram uma taxa de falsos-positivos de 5,26% e de falsos-negativos de 3,12%, maior que a encontrada neste estudo.

Os oligonucleotídeos específicos para *L. monocytogenes* utilizados neste estudo foram os mesmos utilizados por Ryuet al. (2013), que desenvolveram uma reação de PCR multiplex para a detecção rápida e simultânea de seis espécies de *Listeria* isoladas de carne processada. No estudo de Ryuet al. (2013), a reação de PCR multiplex foi aplicada com sucesso para 93 isolados

de *Listeria*, dos quais foram identificadas 81 cepas de *L. monocytogenes*, 10 cepas de *L. innocua* e duas cepas de *L. welshimeri*.

A sensibilidade e especificidade da reação de Ryuet al. (2013) foi testada com cepas de referência e a eletroforese em gel de agarose confirmou que todos os pares de iniciadores utilizados amplificaram os produtos de PCR desejados. Isto implica que os pares de iniciadores utilizados por Ryuet al. (2013) são específicos para a detecção das espécies de *Listeria* pesquisadas, o que impossibilita resultados falsos-positivos.

4.3.2. Identificação dos isolados obtidos por meio de sequenciamento gênico

O sequenciamento da região amplificada do gene 16S rDNA foi realizado com o objetivo de identificar e agrupar filogeneticamente os isolados obtidos, além de confirmar o número de isolados realmente pertencentes ao gênero *Listeria*.

Os resultados do alinhamento comparativo das sequências obtidas estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3- Espécies de maior similaridade com os isolados sequenciados, de acordo com o alinhamento utilizando sequências contidas no banco de dados GenBank (NCBI).

Isolado	Espécie com maior similaridade	Similaridade (%)	Código	Número de nucleotídeos
1	<i>Listeria monocytogenes</i>	99	NR_102780.1	1351
2	<i>Listeriafleischmanniisubsp. coloradonensis</i>	96	NR_109543.1	770
3	<i>Microbacteriumindicum</i>	97	NR_042459.1	770
4	<i>Listeriafleischmanniisubsp. coloradonensis</i>	97	NR_109543.1	1.404
5	<i>Listeriafleischmanniisubsp. coloradonensis</i>	97	NR_109543.1	910
6	<i>Listeriafleischmanniisubsp. coloradonensis</i>	97	NR_109543.1	1403
7	<i>Listeriafleischmanniisubsp. coloradonensis</i>	97	NR_109543.1	490
8	<i>Listeriafleischmanniisubsp. coloradonensis</i>	97	NR_109543.1	644
9	<i>Enterococcusfaecium</i>	99	NR_102790.1	980
10	<i>Enterococcushirae</i>	98	NR_075022.1	940
11	Falha no sequenciamento	-	-	-
12	<i>Listeriafleischmanniisubsp. coloradonensis</i>	96	NR_109543.1	945
13	<i>Staphylococcussaprophyticussubsp. saprophyticus</i>	95	NR_074999.1	1464
14	<i>Enterobacterasburiae</i>	99	NR_074722.1	840
15	<i>Enterococcushirae</i>	100	NR_075022.1	791
16	<i>Listeriafleischmanniisubsp. coloradonensis</i>	97	NR_109543.1	850
17	<i>Listeriafleischmanniisubsp. coloradonensis</i>	97	NR_109543.1	772
18	<i>Listeriafleischmanniisubsp. coloradonensis</i>	97	NR_109543.1	950
19	<i>Listeriafleischmanniisubsp. coloradonensis</i>	96	NR_109543.1	1343
20	<i>Listeriafleischmanniisubsp. coloradonensis</i>	97	NR_109543.1	979
21	<i>Listeriafleischmanniisubsp. coloradonensis</i>	98	NR_109543.1	769

Os resultados obtidos pelo sequenciamento indicaram que o isolado 1 apresenta sequência com alta similaridade a da bactéria identificada como *L. monocytogenes* (NR_102780.1), confirmando a identidade deste patógeno e o resultado obtido anteriormente pela análise de PCR.

Treze isolados apresentaram sequência similar a da bactéria identificada como *L. fleischmanni* subsp. *coloradonensis*, confirmando no total, 14 espécies do gênero *Listeria*.

O sequenciamento indicou que seis dos isolados suspeitos pelo método convencional não pertenciam ao gênero *Listeria*. Os isolados de número 3, 9, 10, 13, 14 e 15 tiveram alta similaridade gênica com as espécies *Microbacterium indicum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterobacter asburiae* e *Enterococcus hirae*, respectivamente, de acordo com busca no banco de dados GenBank.

De acordo com os resultados obtidos pela metodologia oficial da ISO-11290-1 as amostras de melão apresentaram ocorrência de 14% de *Listeria* spp. (21/150). No entanto, como pôde ser observado, após análise de sequenciamento gênico, esta incidência foi reduzida para 9,33% (14/150). A identidade de um dos isolados suspeitos não pôde ser confirmada devido à baixa amplificação do gene 16S no processo de sequenciamento.

Penteado e Leitão (2009) encontraram incidência de 5% de *Listeria* spp. em amostras de melão, valor próximo ao encontrado neste estudo. Segundo os autores a contaminação foi maior em amostras coletadas em feiras livres quando comparadas com aquelas obtidas em centrais de abastecimento (CEASA). Assim como Penteado e Leitão (2009), observou-se nesse trabalho que os melões provenientes das feiras livres foram os que apresentaram contaminação por *Listeria* spp. Das 150 amostras de melão analisadas neste estudo, 87 foram coletadas em feiras, o que pode ter contribuído para a alta incidência de *Listeria* spp. Normalmente em feiras livres as frutas ficam ao ar livre e são muito manipuladas, além de não passarem por nenhum processo de limpeza ou sanitização, o que favorece os maiores níveis de contaminação das frutas.

Dentre os micro-organismos isolados, os de número 9, 10 e 15, apresentaram sequências similares as de bactérias do gênero *Enterococcus*, de acordo com busca no banco de dados GenBank. A identificação de bactérias deste gênero e desperta interesse, uma vez que algumas de suas espécies estão associadas à infecções hospitalares em todo o mundo (CDC, 2014c).

O gênero *Enterococcus* pertence a um grupo de bactérias heterogêneas que inclui mais de trinta espécies, dentre as quais destacam-se *E. faecalis* e *E. faecium* como as mais frequentemente encontradas em alimentos enquanto que outras espécies como *E. durans*, *E. hirae* e *E. gallinarum* são isoladas com menor frequência (TEIXEIRA et al., 2007; PANGALLO et al., 2008). As bactérias do gênero *Enterococcus* são naturais do trato gastrointestinal dos seres humanos e animais, além de muitas espécies serem encontradas também no meio ambiente em geral (TEIXEIRA e FACKLAM, 2003).

Ao contrário da maioria das bactérias ácido-láticas, o gênero *Enterococcus* não é considerado GRAS (Geralmente Reconhecidos como Seguros). São consideradas importantes em tecnologia de queijos, mas têm surgido como patógenos oportunistas, especialmente em hospedeiros imunocomprometidos (GALES et al., 2009; BENDER et al., 2009; LIN et al., 2012).

Enterococcus, principalmente *E. faecalis* (80 a 90%) e *E. faecium* (5 a 15%), são considerados a segunda maior causa de infecções hospitalares nos Estados Unidos, sendo responsáveis por causar endocardite bacteriana, infecções intestinais e infecções urinárias (MOURA et al., 2006, CDC, 2014c).

Um fator importante para a saúde pública é que as bactérias do gênero *Enterococcus* possuem formas de resistência intrínseca e adquirida a vários antibióticos, o que reduz significativamente as opções de tratamento à infecções causadas por eles (HENRIQUE, 2008). Devido as diversas infecções provocadas por *E. faecium* e sua resistência ao antibiótico vancomicina, este micro-organismos é atualmente considerado um patógeno emergente e desafiante patógeno hospitalar (CVE, 2014). Neste sentido, como foi detectada a presença de uma cepa deste micro-organismo nas amostras de melões estudadas, a preocupação do consumidor com relação a esta fruta pode se tornar maior.

4.3.3. Avaliação de similaridade genética entre os isolados

Devido a identificação do isolado 1 como *L. monocytogenes*, foi realizado o alinhamento de sua sequência com as sequências de outros isolados encontrados neste trabalho. Os resultados estão expressos na tabela 4.

Tabela 4- Similaridade do patógeno *L. monocytogenes* com alguns dos demais isolados

Isolado	Alinhamento (%)	Similaridade (%)
4	99	96
19	99	96
6	99	95
8	99	95
10	100	95
15	100	95
2	100	95
9	100	94
13	100	93
14	100	82
3	100	82

Nem todas as sequências obtidas dos isolados foram utilizadas no alinhamento com o patógeno *L. monocytogenes* (isolado 3) pois, ao serem sequenciadas, regiões distintas do gene foram amplificadas para essas amostras. As amostras não alinhadas foram as de número 5, 7, 11, 12, 16, 17, 18, 20 e 21. Apesar destas amostras não serem aplicadas, os isolados utilizados foram capazes de representar todas as espécies bacterianas identificadas neste estudo.

A alta similaridade gênica dos isolados descritos na tabela 4 com *L. monocytogenes*, isolado 1, indica que tais micro-organismos podem apresentar características de colônias semelhantes ou respostas fenotípicas parecidas nos testes bioquímicos. Sendo assim, apesar de os isolados de número 3, 9, 10, 13, 14 e 15 não apresentarem sequências compatíveis com a sequência de qualquer bactéria do gênero *Listeria*, apresentaram alta similaridade gênica com o isolado 1 (*L. monocytogenes*), o que pode ter levado esses micro-organismos a apresentarem comportamentos fenotípicos semelhantes ao gênero *Listeria* nos meios seletivos utilizados pelo método convencional, induzindo aos resultados falso-positivos encontrados.

Para entender melhor as relações evolutivas entre as várias espécies e as suas proximidades filogenéticas foi gerado um filograma radial das sequências de DNA e dos alinhamentos resultantes desta (Figura 3). Para tanto foi utilizado o programa *TreeDyn*198,3(CHEVENET et al., 2006).

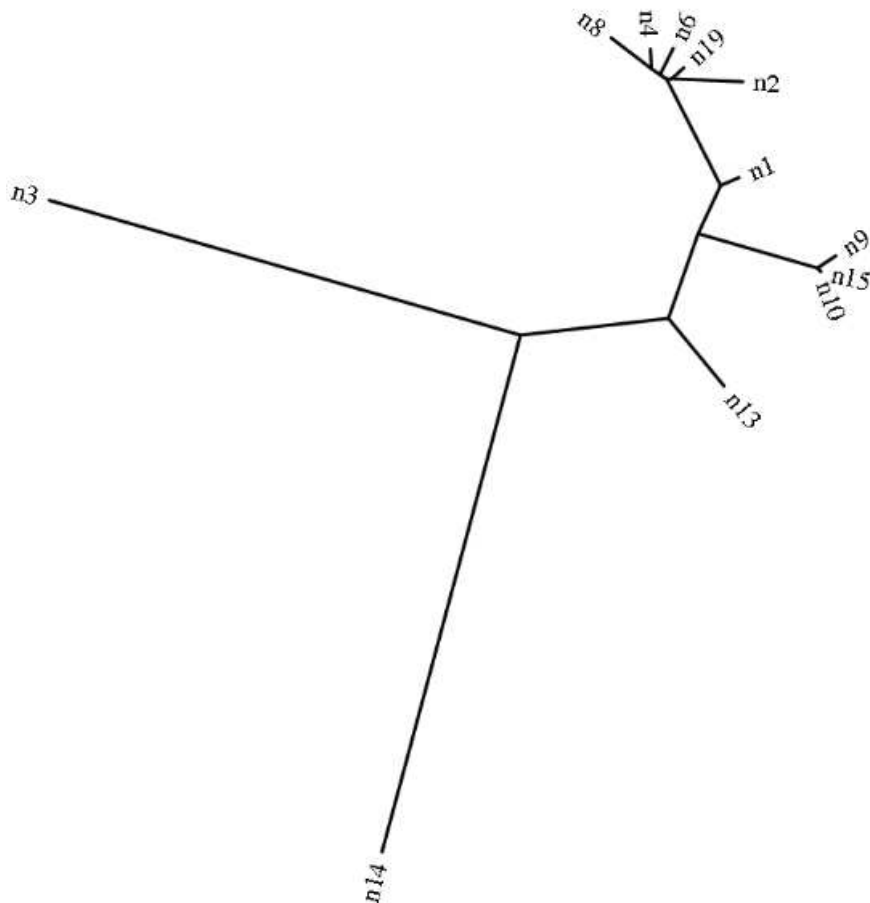


Figura 3- Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene 16S das espécies identificadas.

A árvore filogenética representa graficamente as relações evolutivas entre várias espécies e consiste de nós conectados por braços. Nós terminais representam sequências ou organismos que estão sendo estudados, enquanto que nós internos representam os hipotéticos ancestrais (PAGE e HOLMES, 1998; YANG, 2006).

De acordo com o filograma gerado foi possível verificar que os isolados de número 1, 4, 6, 8 e 19 (*L.fleischmannii*) possuem alta similaridade genética entre si e possuem relações evolutivas similares, uma vez que localizam-se

muito próximos no filograma e se originam da mesma bifurcação (ou nó). O mesmo ocorre entre os isolados de número 9, 10 e 15 (*Enterococcus*).

A matriz apresentada não foi adaptada para avaliar a distância filogenética exata entre os isolados, no entanto, pela distância dos braços e pelos resultados apresentados na tabela 4 é possível identificar que o isolado de número 1, *L. monocytogenes*, possui maior similaridade com os isolados identificados como pertencentes às espécies de *L. fleischmanni* e *Enterococcus*, seguido dos isolados identificados como pertencentes às espécies *Staphylococcus saprophyticus*, *Microbacterium indicum* e *Enterobacter asburiae*.

4.4. Sorotipagem da cepa de *L. monocytogenes* isolada de melão

Este procedimento foi realizado com o objetivo de estabelecer a correlação dos sorotipos presentes nas frutas com os sorotipos de maior patogenicidade.

De acordo com o Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz o isolado de número 1, *L. monocytogenes*, encontrada na amostra de melão, apresentou sorotipagem 1/2b.

Sabe-se que nem todas as cepas de *L. monocytogenes* são igualmente capazes de causar doenças em seres humanos. A espécie *L. monocytogenes* possui 13 diferentes sorotipos, no entanto, os sorotipos 4b, 1/2a e 1/2b são os responsáveis por mais de 90 % dos casos de listeriose humana (GOULET ET AL., 2006; LIANOU et al., 2006; LIU, 2006; GOMES, 2014). Dessa forma, a sorotipagem indicou que a cepa de *L. monocytogenes* encontrada é potencialmente perigosa, uma vez que seu sorotipo, 1/2b, está amplamente associado com grande parte dos surtos de listeriose em humanos no mundo.

4.5. Perigo associado ao melão e jabuticaba

No presente trabalho não foi detectada a presença de *Listeria* spp. nas amostras de jabuticaba. Já nas amostras de melão foi detectada uma ocorrência de 9,33% (14/150), sendo que das 14 espécies de *Listeria* confirmadas, uma era do patógeno *L. monocytogenes*.

A presença de 14 espécies do gênero *Listeria* nos frutos de melão indica que o ambiente é propício para o crescimento de *L. monocytogenes*, uma vez que as restrições para a sobrevivência e multiplicação são semelhantes entre

as espécies do gênero, e, apesar de uma única cepa de *L. monocytogenes* ter sido encontrada, sabe-se que sua presença pode ter sido subestimada devido a presença dessas outras espécies do gênero, que são capazes de se multiplicar nos meios de enriquecimento seletivo, e podem reprimir o crescimento do patógeno, impedindo sua detecção.

Devido à importância que a bactéria *L. monocytogenes* representa à saúde pública, mesmo a detecção de uma única cepa nas amostras é suficiente para inferir que o alimento contaminado pode ser prejudicial à saúde do consumidor. A preocupação se deve ao fato de que o melão é muito consumido na forma *in natura* e frequentemente não é submetido a qualquer tratamento que assegure a eliminação desta bactéria. Além disso, esta fruta é usualmente refrigerada por longos períodos de tempo, o que pode elevar os números desse patógeno a valores inaceitáveis.

Apesar da detecção de *Listeria* spp. nas amostras de melão analisadas, da presença de uma cepa de *L. monocytogenes* e ao recente surto associado ao consumo desta fruta (CDC, 2011b), existem ainda poucos estudos na literatura que avaliam a incidência de *Listeria* spp. ou *L. monocytogenes* em melão.

Vahidiet al. (1992) e Penteado e Leitão (2009) também avaliaram a presença de *L. monocytogenes* em melão, no entanto nenhuma cepa do patógeno foi encontrada nas amostras estudadas por estes autores. Já Penteado e Leitão (2009) encontraram somente uma das espécies do gênero *Listeria*, *L. welshimeri*, mas concluíram que os frutos de melão são bons substratos para a sobrevivência e multiplicação de qualquer espécie do gênero *Listeria*.

Com relação a jabuticaba, por ser uma fruta exótica e pouco explorada comercialmente, é ainda muito pouco estudada não tendo relatos sobre a incidência de *Listeria* nessa fruta. No entanto, por ser consumida *in natura*, normalmente com a casca e sem prévia sanitização, sabe-se que a avaliação da incidência de patógenos, como *L. monocytogenes*, é importante.

Neste estudo não foi detectada a presença do gênero *Listeria* em nenhuma das 60 amostras de jabuticaba analisadas. Esta ausência pode ser explicada devido ao rápido tempo de formação dos frutos e a curta vida útil (até 7 dias após a colheita) o que impede um grande tempo de exposição dos frutos

as diversas fontes de contaminação. Além disso, devido a baixa disponibilidade do fruto nos comércios locais, as amostras foram coletadas direto da planta e levadas para a análise, o que reduz substancialmente as fontes de contaminação pós-colheita e por manipuladores.

Sobierajski (2014) afirma que processos fermentativos podem começar a ocorrer na polpa e casca da jabuticaba até no mesmo dia da colheita, o que pode evitar a multiplicação de *Listeria* devido à competição com altas concentrações de lactobacilos.

Neste estudo, ao todo, foram analisadas 210 amostras de frutas. A incidência total de *L. monocytogenes* foi de 0,47%, abaixo da média encontrada por autores que analisaram *L. monocytogenes* em frutas (~ 2%).

O melão é uma fruta mais potencialmente susceptível a contaminação por *L. monocytogenes*, já que é cultivada no solo, uma das principais fontes deste patógeno, no entanto outra importante fonte de contaminação vem sendo considerada, que são os refrigeradores industriais, varejistas ou domésticos. Eles podem possibilitar a contaminação cruzada entre os alimentos, já que *L. monocytogenes* consegue sobreviver e multiplicar em condições de refrigeração. O que preocupa neste caso, é o fato de que frutas como melão e jabuticaba podem ser armazenadas sob baixas temperaturas e, após o armazenamento, serem consumidas sem qualquer tratamento.

Embora o crescimento de micro-organismos psicrotróficos sob refrigeração seja lento, os produtos que têm uma vida útil maior, como o melão, podem conter *L. monocytogenes* em números elevados no final de sua vida de prateleira (FOODSAFETY, 2002).

Estudos que avaliam a presença de *L. monocytogenes* em refrigeradores evidenciam este problema de contaminação. Sergelidis et al. (1997) estudaram a prevalência de *Listeria* sp. em refrigeradores domésticos, varejistas e industriais, na Grécia e encontraram 1,5% das amostras positivas para *L. monocytogenes*. Já Jackson et al. (2007) na Irlanda, analisaram 342 refrigeradores domésticos e encontraram 1,2% contaminados com *L. monocytogenes*.

Sabe-se que a ocorrência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em vegetais é baixa quando comparada com sua incidência em produtos cárneos ou lácteos, no entanto, nos últimos anos o número de surtos associados ao

consumo desses alimentos têm aumentado. A importância das frutas como fonte do patógeno ganhou maior atenção quando o surto alimentar mais fatal dos Estados Unidos envolveu o consumo de melões contaminados por *L. monocytogenes* em 2011 (CDC, 2011b), diante disso, se torna imprescindível identificar as principais frutas que podem veicular esse patógeno.

5. CONCLUSÃO

Como foi possível identificar 14 espécies de *Listeria* spp. nas amostras de melão, podemos concluir que esta fruta suporta bem o crescimento de qualquer espécie do gênero *Listeria*, incluindo o patógeno *L. monocytogenes*, e que por ser uma potencial fonte deste patógeno, medidas de controle e prevenção devem ser adotadas com maior severidade para esta fruta.

Com relação aos métodos empregados para detecção de *L. monocytogenes*, apesar do teste imunológico não ter sido capaz de detectar a presença da cepa de *L. monocytogenes*, ele apresentou uma taxa de falsos-negativos ainda dentro do limite proposto pelo método, estando apto para ser utilizado em triagem de amostras.

Podemos concluir que mesmo que vários estudos comparativos tenham sido relatados, nenhum esquema de detecção demonstra tanta superioridade a ponto de ser adotado universalmente e estudos demonstram que tanto a metodologia convencional, quanto as metodologias alternativas, como as técnicas de imunológico e de PCR, são reconhecidamente eficazes na detecção de patógenos.

6. REFERÊNCIAS

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

ANONYMOUS. Surveillance for foodborne disease outbreaks — United States, 2007. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 59, p. 973–979, 2010.

BALERDI, C. F.; RAFIE, R.; CRANE, J. Jabuticaba (*Myrciariacauliflora*, Berg) a delicious fruit with an excellent market potencial. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Flórida, v.119, p.66-68, 2006.

BARANCELLI, G.V.; SILVA-CRUZ, J.V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C. A. F. *Listeria monocytogenes*: Ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.1, p.155-168, 2011.

BENDER, E.A.; FREITAS, A.L.P.; REITER, K.C.; LUTZ, L.; BARTH, A.L. Identification, antimicrobial resistance and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated in Porto Alegre, Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 693-700, 2009.

BENETTI, T. M.; MONTEIRO, C. L. B.; BEUX, M. R.; ABRAHÃO, W. M. 2014. Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Listeria* sp. and *Salmonella* sp. in sausage: A comparison with conventional methods. **Brazian Journal Microbiology**.2013; v. 44, n. 3, p. 791–794, 2013.

BERTSCH, D.; RAU, J.; EUGSTER, M. R.; HAUG, M. C.; LAWSON, P. A.; LACROIX, C.; MEILE, L. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 526-532, 2013.

BEUCHAT, L. R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**. V. 59, p. 204-216, 1996.

BHARATHI, S.; RAMESH, M. N.; VARADARAJ, M. C. Predicting the behavioural pattern of *Escherichia coli* in minimally processed vegetables. **Food Control**, v. 12, p. 275-284, 2001.

BOER, E.; BEUMER, R. R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p.119-130, 1999.

BORGES, E.; MONTE, L. G. C.; ROCHA, R. S.; JÚNIOR. O. M.; MODESTO, T. F. **Vinho de jabuticaba**. III Encontro Científico e Simpósio de Educação Uni salesiano, Lins, 17 – 21 de outubro de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília DF, 18 de Setembro de 2003. Seção 1, p. 14. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: Julho de 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. **Diário Oficial da União**. Brasília DF, 11 março de 1996. Seção I. 50p. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>>. Acesso em: Julho de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**. Brasília DF, 10 de janeiro de 2001. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 11/2012.

BRAZILIAN FRUIT. **A fruticultura no Brasil**. 2013. Disponível em: <<http://www.brazilianfruit.org.br/Pbr/Fruticultura/Fruticultura.asp>>. Acesso em: Julho de 2013.

BRAZILIAN FRUIT. **Melão – Recomendações e Sugestões**. 2001. Disponível em: <http://www.brazilianfruit.org.br/Informacoes_para_o_Consumidor/Recomenda%E7%F5es_mel%E3o.asp>. Acesso em: Julho de 2014.

BRUNINI, M. A.; OLIVEIRA, A. L.; SALANDINI, C. A. R.; BAZZO, F. R. Influência de embalagens e temperatura no armazenamento de jabuticabas (*Myrciaria jabuticaba* (Vell) Berg) cv 'SABARÁ'. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 378-383, 2004.

CDC (a) – Center For Disease Control and Prevention. 2013. **Listeria monocytogenes**. 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/listeria.html>>. Acesso em: Julho de 2013.

CDC (b) - Centers for Disease Control and Prevention. 2011. **multistate outbreak of Listeria monocytogenes infections (listeriosis) ended in October, 2011**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/082712/index.html#introduction>>. Acesso em: Julho de 2013.

CDC (c) -Centers for Disease Control and Prevention. **Information for the public about VRE**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/HAI/organisms/vre/vre-infection.html>>. Acesso em: Julho de 2014.

CEAGESP - Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo. 2002. **O cultivo do melão no Brasil**. Disponível em: <http://www.ceagesp.gov.br/produtor/classific/fc_melao> Acesso em: Julho de 2013.

CITADIN, I.; DANNER, M. A.; SASSO, S.A.Z. Jabuticabeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, 2010.

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

CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica. 2014. **Enterococos resistente à vancomicina (ERV ou VRE)**. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/ih/NT07_IHENTERO.pdf>. Acesso em: Junho de 2014.

D'OVÍDIO, LOREDANA. Listeriose. **Manual sobre a Listeriose**. Disponível em: <http://www.zoonoses.org.br/absoluto/midia/imagens/zoonoses/arquivos_1330097205/3072_listeriose.pdf>. Acesso em: Junho de 2014.

DAL RI, E.S. **Avaliação do processo produtivo e da qualidade de polpas de frutas comercializadas em Boa Vista/RR**. 2006. 166f. Dissertação (Mestrado em recursos naturais). Universidade Federal de Roraima, Boa Vista.

DE SÁ, F.R.N.; SZTAJNBOK, J.; DE ALMEIDA, J.F.L.; TROSTER, E.J.; VAZ, F.A.C. *Listeria monocytogenes* pneumonia in a cirrhotic child. **International Journal of Clinical Practice**, v.58, n.5, p.536-538, 2004.

DESTRO, M.T. ***Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva de alimentos: da produção primária ao consumidor final**. São Paulo, 2006. 74f. Tese (Livre Docência). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DIAS, D. A. M. **Persistência de cepas de *Listeria monocytogenes* em linha de abate industrial de frango em um matadouro localizado no Estado de São Paulo**. 2008. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, SP.

DONELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*. In: HUI, Y. H.; PIERSON, M.D.; GORHAM, J. R. (Ed.). **Food Borne Disease Handbook**. 2nd ed. New York: M. Dekker, v. 1, cap. 10, p. 213-246, 2001.

DONNELLY, C. W.; RYSER, E. T. *Listeria*. In: DOWNES, F. P. (Ed.) ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. Ed. Washington: American Public Health Association, p. 243- 356, 2001.

DUFFEY, P. S.; KANI, J. C.; LEE, J. O.; HILL, W. J.; KOKKA, R. *Salmonella* serogroup C2 and C3 identified by agglutination using an immunoglobulin G3 (Kappa) monoclonal antibody (321-1-E3) reactive with a somatic factor 8-like polysaccharide antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 12, p. 3050- 3057, 1992.

DUSSURGET, O.; PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. **Annual Review of Microbiology**, v.58, p.587-610, 2004.

EFSA - European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. **EFSA reports on *Listeria* levels in certain ready-to-eat foods**. 2013. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/130627.htm>>. Acesso em: Dezembro de 2013.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Características do melão para exportação**. 2001. Disponível em: <http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_1472.pdf>. Acesso em: Julho de 2014.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema de produção de melão**. 2010. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melao/SistemaProducaoMelao/index.html>>. Acesso em: Julho de 2014.

FAO/WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. Risk assessments of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: technical report. **Geneva: FAO/WHO**, p. 269, 2004.

FIOCRUZ, Fundação Oswaldo Cruz. 2013. **Jabuticaba**. Disponível em: <<http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inford=1008&sid=2>>. Acesso em: Julho de 2013.

FOODSAFETY. 2002. Risks associated with bacterial pathogens in exported Fruit and vegetables. Disponível em: <http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Risks_Associated-Science_Research.pdf>. Acesso em: Fevereiro de 2014.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed; 2002. p. 169-170.

GALES, A. C.; SADER, H. S.; RIBEIRO, J.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI, A. C. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals: participating in the SENTRY program (2005-2008). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 90-98, 2009.

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

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

GERMANO, M.I.S. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. 3ª ed. Barueri, São Paulo: Manole. **Agentes bacterianos de toxinfecções**, p.277- 356, 2008;

GIACCONE, V.; OTTAVIANI, F. Current Foodborne Pathogens – *Listeria monocytogenes*. In: STORRS, M.; DEVOLUY, M-C.; Cruveiller, p. (eds). **Food Safety Handbook: Microbiological Challenges**. França. Bio-Mériux Education, p. 108-127, 2007.

GOMES, M. J. P. 2014. **Gênero *Listeria* spp.** Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Listeria%204-2014-1.pdf>>. Acesso em: Julho de 2014.

GOULET, V.; JACQUET, C.; MARTIN, P.; VAILLANT, V.; LAURENT, E.; VALK, H. Surveillance of human listeriosis in France, 2001–2003. **EuroSurveill**, v. 11, p. 79, 2006.

GRAVES, L.M.; SWAMINATHAN, B.; HUNTER, S.B. ***Listeria*, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 3ª.ed, cap. 9, p. 283-304, 2007.

GUEDES, M. N. S.; **Diversidade de acessos por meio da caracterização biométrica e físico-química dos frutos e fisiológica das sementes**. 2009. 70f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina-MG.

GUERRA M. M.; MCLAUCHLIN J.; BERNARDO F. A. *Listeria* in ready to eat and unprocessed foods produced in Portugal. **International Journal of Food Microbiology**, v. 18, p. 423-29, 2001.

HENRIQUE, P. M. Molecular characterization of enterococci harboring genpotype and molecular characteriozation of enterococci harboring genotype and in Brazilian hospitals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 301-305, 2008.

HERSCHLEB, J.; ANANIEV, G. & SCHWARTZ, D. C. Pulsed-field gel electroforesis. **Nature Protocols**, v. 2, n. 3, 2007.

HOFER, C.B.; MELLE, C.E.A.; HOFER, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.41, n.6, p.375-377, 1999.

HOFER, E.; DO NASCIMENTO, R. S.; DE OLIVEIRA, M. A. *Listeriamonocytogenes* meningitis. Case reports in patients from the Federal District. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.2, p.173-177, 1998.

HOFER, E.; PESSÔA, G.V.A.; MELLES, C.E.A. Listeriose humana. Prevalência de sorotipos de *Listeria monocytogenes* isolados no Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.44, n.2, p.125-131, 1984.

HOFER, E.; REIS, C.M.F.; HOFER, C.B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas isoladas de material clínico humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.1, p.32-37, 2006.

IBRAF - INSTITUTO BRASILEIRO DA FRUTA. **Marketing Fruta Brasileira, 2013**. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/servicos/ser_marketing.asp>. Acesso em: Julho de 2013.

INOUE S.; NAKAMA A.; ARAI Y.; KOKUBO Y.; MARUYAMA T.; SITO A. Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 73, 2000.

JACKSON, V.; BLAIR, I.S.; MACDOWELL, D.A.; KENNEDY, J.; BOLTON, D.J. The incidence of significant foodborne pathogens in domestic refrigerators. **International Journal Food control**, v. 18, n. 4, p. 346-351, 2007.

JANZTEN, M. M.; NAVAS, J.; CORUJO, A.; MORENO, R.; LÓPEZ, V.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J. V. Review. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 3, p. 235-247, 2006.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. per Publishers, p. 524-536, 2005.

KASNOWSKI, M. C. *Listeria* spp. *Escherichia coli*: Isolamento, identificação estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída. 2004. 111f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.

KERDAHI K.F.; ISTAFANOS P.F. Rapid determination of *Listeria monocytogenes* by automated enzyme-linked immunoassay and nonradioactive DNA probe. **Jornal AOAC**, p. 83-88, 2000.

KLAIBER, R. G.; BAUR, S.; WOLF, G.; HAMMES, W. P.; CARLE, R. Quality of minimally processed carrots as affected by warm water washing and chlorination. **Innovative Food Science and Emerging Technologies Journal**, v. 6, p. 351- 362, 2005.

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**, v. 104, p. 239-248, 2005.

LAKE R.; HUDSON A.; CRESSEY P.; NORTJE G. **Risk profile: *Listeria monocytogenes* in processed ready-to-eat meats. Institute of Environmental Science & Research Limited, Christchurch Science Centre. 2002.**

Disponível em: <
http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Risk_Profile_Listeria_Monocytogenes_Processed-Science_Research.pdf> Acesso em: Julho de 2013.

LANDGRAF, I.M.; KOBATA, A.M.M.; JAKABI, M.; KIRSCHBAUM, C.R.A.; MARCHI, C.R. Surto de meningite neonatal por *Listeria monocytogenes*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n.1, p.63-67, 1999.

LEMES-MARQUES, E.G.; CRUZ, C.D.; DESTRO, M.T. Pheno and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the southwestern region of the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.2, p.287-292, 2007.

LIANOU, A. et al. Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 11, p. 2640-2647, 2006.

LIMA, A. J. B.; DUARTE, A. C.; ALVES, A. P. C. CARVALHO ALVES. Caracterização química do fruto jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e

de suas frações. **Archivos Latino americanos de Nutrición**, v.58, n.4, p.416-421, 2008.

LIMA, H. C. **Modificações de carboidratos estruturais e de enzimas pécticas em jabuticaba [*Plinia trunciflora* (Berg) Kausel - MYRTACEAE]**. 2002. 61f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

LIN, Y.T.; HSIEH, K.S.; CHEN, Y.S.; HUANG, I.F.; CHENG, M.F. Infective endocarditis in children without underlying heart disease. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 20, p. 1-8, 2012.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 645–659, 2006.

LIU, D.; LAWRENCE, M. L.; AUSTIN, F. W.; AINSWORTH, A. J. A multiplex PCR for species and-virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Microbiological Methods**, 71, 133-140, 2007.

LPSN- List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. **Genus *Listeria***. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/listeria.html>>. Acesso em: Agosto de 2014.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.; WHITMAN, W. B. (2009). FAMILY III. LISTERIACEAE. IN VOS, P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K.; WHITMAN, W. B. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, (2nd Edition), Georgia: Springer, 2009.

MACGOWAN, A. R, BOWKER, K., MCLAUCHLIN, J., BENNETT, P.M.; REEVES, D. S. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. **Internacional Journal of Food Microbiology**. v. 21, p. 325-334, 1994.

MARTINS E. A. ***Listeria monocytogenes* em produtos fatiados do tipo ready-to-eat, presunto cozido e salame, comercializados no município de São Paulo: ocorrência, quantificação e sorotipagem.** 2009. 76f. Tese (Doutora do em Saúde Pública). Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MATHIAS, JOÃO. Como plantar jabuticaba. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC1411763-4529-2,00.html>> Acesso em: Abril de 2014.

MCKELLAR, R. C.; DELAQUIS, P. Development of a dynamic growth-death model For *Escherichia coli* O157:H7 in minimally processed leafy green vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 151, p. 7-14, 2011.

MORO, C. V.; DESLOIRE, S.; VERNOSY-ROZAND, C.; CHAUVE, C.; ZENNER, L. Comparison of the VIDAS Ò system, FTA Ò filter-based PCR and culture on SM ID for detecting *Salmonella* in *Dermanyssusgallinae*. **Journal Applied Microbiology**, v. 44, p. 431-436, 2007.

MULLIS, K. B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Annals of Applied Biology Journal**, v. 48, n. 8, p. 579-82, 1990.

MUNIZ, J.A.; ABREU, A.R. **Técnicas de amostragem.** Lavras: UFLA/FAEPE, p. 102, 1999.

MURRAY, E.G.D.; WEBB, R.A.; SWANN, M.B.R. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leukocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*(n.sp.). **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v.29, p.407-439, 1926.

NGUYEN-A, C.; CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p. 371–401, 1994.

NYFELDT, A. Etiologie de la mononucleose infecteuse. **Comptes Rendus Biologies Journal**, v. 101, p. 590, 1929.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 1661–1669, 1999.

OLIVEIRA, A. L.; BRUNINI, M, A.; SALANDINI, C. A. R; BAZZO, F. R. Caracterização tecnológica de jabuticabas 'Sabará' provenientes de diferentes regiões de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.3, p. 397-400, 2003.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.41, p.97-106, 2010.

PAGE, R.D.M.; HOLMES, E.C. **Molecular evolution: A phylogenetic approach**. Oxford: Blackwell Science. p. 346, 1998.

PAOLI G.C.; BHUNIA A.K.; BAYLES D.O. *Listeria monocytogenes*. In: **Foodborne pathogens, microbiology and molecular biology** (Fratamico P.M., Bhunia A.K. & Smith J.L., ed.). Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK, p. 295-325, 2005.

PENTEADO, A. L. **Incidência e desenvolvimento de *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. em frutas de baixa acidez**. 2003. 117 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

PREVET. Técnicas para diagnóstico molecular. Disponível em: <<http://www.prevet.com.br/wp-content/uploads/2013/08/diagnostico-molecular-signed.pdf>>. Acesso em: Julho de 2013.

REIS, R. B.; MAMIZUKA, E. M.; FRANCO, B. D. G. M. Produção de imunorreagentes para uso em um teste imunoenzimático de detecção de

Salmonella em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 261-266, 2001.

RICO, D.; MARTIN-DIANA, A. B.; BARAT, J. M.; BARRY-RYAN, C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. **Trends in Food Science and Technology**, Vol. 18, p. 373–386, 2007.

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

ROCOURT, J.; BUCHRIESER, C. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. (Ed.). 3.ed. **Listeria, listeriosis and food safety**. Boca Raton: CRC Press, Cap. 1, p.1-20, 2007.

ROCOURT, J.; JACQUET, C.; REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and sea foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 197-209, 2000.

RURALBR. Maior plantação de jaboticabas do mundo atrai turistas em Goiás. Disponível em: <<http://agricultura.ruralbr.com.br/noticia/2013/11/maior-plantacao-de-jaboticabas-do-mundo-atrai-turistas-em-goias-4334882.html>>. Acesso em: Agosto de 2013.

RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K.(Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination on foods**. 4^o ed. Washington: American Public Health Association, p.343-356, Cap. 36, 2001.

SADO, P. N.; JINNEMAN, K. C.; HUSBY, G. J.; SORG, S. M.; OMIECINSKI, C. J. Identification of *Listeria monocytogenes* from a pasteurized apple juice using rapid test kits. **Journal Food Protection**, v. 61, p. 199-202, 1998.

SANTOS, T. B. A.; SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. Micro-organismos indicadores em frutas e hortaliças minimamente processadas. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 141-146, 2010

SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C. V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical Microbiology Reviews**.4, n.2, p. 169-183, 1991.

SCHWAB, J.P.; EDELWEISS, M.I. A. Identification of *Listeria monocytogenes* in human placentas and abortion species through immune histochemical technique. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.2, p.111-114, 2003.

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Melão**. 2013. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/setor/fruticultura/o-setor/frutas-de-g-a-z/melao>> Acesso em: Julho de 2013.

SERDELIDIS, D.; ABRAHIM, A.; SARIMVEI, A.; PANOULIS, C. KARAIANOGLU, P.; GENIGEORGIS, C. Temperature distribution and prevalence of *Listeria* spp. in domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. **International Journal of Food Microbiology**, v.34, p.171-177, 1997.

SILVA, A. C. M. **A influência do tempo de refrigeração na virulência inicial de *Listeria monocytogenes***. 2010. 64f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar). Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa-Portugal.

SILVA, L. M. M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; SOUSA, F. C.; SOUSA, E. P.; LIMA, A. K. V. O. Parâmetros químicos, físicos e físico-químicos de três variedades de melão. **Revista Verde**, Mossoró-RN, Brasil, v.6, n.5, p. 242-246, 2011.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, F. A. N.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, p. 536, 2007.

SIVAPALASINGAM, S.; FRIEDMAN, C.R.; COHEN, L.; TAUXE, R.V. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United

States, 1973 through 1997. **Journal of Food Protection**, Vol. 67, p. 2342- 2353, 2004.

SVS/MS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIA DA SAÚDE, BRASIL. **Análise Epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1012**. Disponível em: <<http://www.cvs.saude.sp.gov.br/>> Acesso em: junho de 2014.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection Journal**, v. 9, n. 10, p. 1236-1243, 2007.

SZABO, E. A.; SCURRAH, K. J.; BURROWS, J. M. Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. **Letters in Applied Microbiology Journal**, v. 30, p. 456–460, 2000.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infection Control and Hospital Epidemiology Journal**, Thorofare, v. 18, p. 426-439, 1997.

THOMASON, B. M. Rapid detection of Salmonella microcolonies by fluorescent antibody. **Journal of Applied Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 1064-1069, 1971.

TODA FRUTA. **Melão**. 2011. Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br/noticia/23108/MEL%C3O>> Acesso em: Julho de 2013.

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

VAHIDY, R. Isolation of *Listeria monocytogenes* from fresh fruits and vegetables. **Hort Science Journal**, v. 27, p. 628, 1992.

VAHIDY, R.; JAHAN, F.; NASIM, R.; Isolation of *Listeria monocytogenes* from fresh fruits and vegetables. **Hort Science Journal**, v. 27, n. 6, p. 628, 1992.

VALK, H.; JACQUET, C.; GOULET, V.; VAILLANT, V.; PERRA, A.; SIMON, F.; DESENCLOS, J. C.; MARTIN, P. Surveillance of *Listeria* infections in Europe. **Euro surveil lance**, v. ¹⁰, p. 10, 2005.

VARMA, J.K.; SAMUEL, M.C.; MARCUS, R.; HOEKSTRA, R.M.; MEDUS, C.; SEGLER, S.; ANDERSON, B.J.; JONES, T.F.; SHIFERAW, B.; HAUBERT, N.; MEGGINSON, M.; MCCARTHY, P.V.; GRAVES, L.; GILDER, T.V.; ANGULO, F.J. *Listeria monocytogenes* infection from foods prepared in a commercial establishment: a case–control study of potential sources of sporadic illness in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p. 521–528, 2007

VAZ-VELHO, M.; DUARTE, G.; GIBBS, P. Evaluation of mini-VIDAS rapid test for detection of *Listeria monocytogenes* from production lines of fresh to cold-smoked fish. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 147-151, 2000.

VIEGAS, S.J. **Alterações do estado de saúde associadas à alimentação : contaminação microbiológica dos alimentos** / Silvia Judite Viegas. – Lisboa : Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Departamento de Alimentação e Nutrição. Unidade de Observação e Vigilância, 32 p. 2009.

WIEDMANN, M. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 2, 2002.

YANG, Z. **Computational molecular evolution**. New York: Oxford University press. p. 357, 2006.