UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da segurança microbiológica de hortaliças minimamente processadas, pela enumeração de microrganismos indicadores, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* por métodos convencionais e aplicação da PCR em tempo real na quantificação de *Listeria monocytogenes*

Maria Aparecida de Oliveira

Ribeirão Preto
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da segurança microbiológica de hortaliças minimamente processadas, pela enumeração de microrganismos indicadores, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* por métodos convencionais e aplicação da PCR em tempo real na quantificação de *Listeria monocytogenes*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Maria Aparecida de Oliveira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elaine Cristina Pereira De Martinis

Ribeirão Preto
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Oliveira, Maria Aparecida

Avaliação da segurança microbiológica de hortaliças minimamente processadas, pela enumeração de microrganismos indicadores, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* por métodos convencionais e aplicação da PCR em tempo real na quantificação de *Listeria monocytogenes*. Ribeirão Preto, 2008

139 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: De Martinis, Elaine Cristina Pereira

1. *Listeria monocytogenes* 2. hortaliças minimamente processadas.
3. PCR em tempo Real. 4. Avaliação microbiológica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Aluno: Maria Aparecida de Oliveira

Título do Trabalho: Avaliação da segurança microbiológica de hortaliças minimamente processadas, pela enumeração de microrganismos indicadores, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* por métodos convencionais e aplicação da PCR em tempo real na quantificação de *Listeria monocytogenes*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elaine Cristina Pereira de Martinis

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Ao meu eterno companheiro, Doair, pelo amor,
carinho e paciência.*

*Ao meu pai, Oriovaldo, pela vida e pela
oportunidade e incentivo para estudar.*

*Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos pela
dedicação carinhosa.*

*A estrela mais brilhante do céu que ilumina todos
os dias da minha vida, minha mãe Adelina. Saudades.*

Dedico

Agradecimento especial

*À minha orientadora,
Prof^a. Dr^a. Elaine C. P. De Martinis,
pela oportunidade,
conhecimentos compartilhados
orientação,
dedicação,
e amizade.*

Obrigada

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida e força para perseverar.

À diretora do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto (IALRP): Dr^a. Suzel N. Neme pela liberação para participação no curso de Pós-Graduação.

Às amigas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do IALRP: Alzira, Eliana e Solange, obrigada pela compreensão, paciência e colaboração técnica neste trabalho.

À chefia da Seção de Bromatologia do IALRP, obrigada pelo apoio incondicional.

Aos funcionários e colegas dos Laboratórios de Meios de Cultura e Esterilização do IALRP: Ângela, Antônio Carlos, Clóvis, Lousane, Rita de Cássia, Terezinha e Tutu (que Deus o ilumine), pelo muito que me ajudaram.

À Brisa pela colaboração na etapa final das análises microbiológicas deste trabalho.

A todos os colegas e amigos do IAL Ribeirão Preto, pelo apoio, incentivo e vibrações positivas.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

Aos docentes e funcionários do Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP/USP pela ajuda sempre tão oportuna.

À amiga que sempre estará nos meus pensamentos: Lizziane, obrigada pela, confiança, paciência e cumplicidade nos momentos difíceis.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCFRP/USP: Bruna, Fabrício, Fernanda, Marina, Marta, Patrícia, Rafael e Vanessa. Obrigada pela ajuda e amizade.

Ao Prof. Dr. Gustavo H. Goldman, funcionários e amigos do Laboratório de Biologia Molecular da FCFRP/USP pela liberação do laboratório para a realização de parte de nossos experimentos.

A Ângela e Aparecida sempre prontas a cooperar.

À Prof.^a Dr.^a Maria Teresa Destro pelas valiosas sugestões como assessora científica deste trabalho.

À FAPESP pelo financiamento do projeto (processo n.º 2006/06401 – 3).

A todos que de alguma forma colaboraram para realização do meu trabalho.

Muito obrigada!

"A primeira e melhor vitória é conquistar a si mesmo"

Platão

"A persistência é o caminho do êxito."

Charles Chaplin

RESUMO

OLIVEIRA, M.A. **Avaliação da segurança microbiológica de hortaliças minimamente processadas, pela enumeração de microrganismos indicadores, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* por métodos convencionais e aplicação da PCR em tempo real na quantificação de *Listeria monocytogenes*.** 2008. 139f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A vida moderna tem gerado mudanças importantes nos hábitos alimentares em todo o mundo e observa-se um aumento da demanda por alimentos prontos para o consumo, tais como frutas e hortaliças minimamente processadas. As condições de embalagem e armazenamento destes produtos podem favorecer a multiplicação de bactérias psicrotróficas, destacando-se o patógeno *Listeria monocytogenes*. Para estudos de avaliação de riscos microbiológicos relativos a *L. monocytogenes*, dados quantitativos são fundamentais, mas, os métodos para enumeração disponíveis atualmente são trabalhosos e morosos. Há grande interesse no desenvolvimento de métodos rápidos para a determinação das populações de *L. monocytogenes*, o que pode reduzir significativamente o tempo de análise. Neste trabalho, foram analisadas 162 amostras de hortaliças minimamente processadas adquiridas no comércio varejista de Ribeirão Preto/SP, no período de setembro de 2007 a agosto de 2008. Foram realizados ensaios convencionais para enumeração de coliformes totais e termotolerantes, *Escherichia coli* e bactérias aeróbias psicrotróficas. Foi realizada a detecção de *Listeria* sp. por imunoensaio (Oxoid *Listeria Rapid Test*) e de *Salmonella* por método convencional. Alíquotas congeladas de amostras positivas para *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. foram também avaliadas quantitativamente empregando-se métodos convencionais. Para quantificação de *L. monocytogenes* foi utilizado o método da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) em tempo real, com *primers* de DNA baseados em 16S rRNA. Para a comparação do método de PCR em tempo real e método convencional de cultivo, foram inoculadas seis amostras de hortaliças minimamente processadas (alface, cheiro-verde, couve, almeirão, repolho e acelga) com três níveis de inoculação. Dentre as 162 amostras de hortaliças analisadas, *L. monocytogenes* foi detectada em uma amostra de couve e uma de cheiro-verde, com populações de $1,5 \times 10^3$ e 0,43 NMP/g, respectivamente. *Salmonella* sp. foi isolada de duas amostras de almeirão, com populações de 0,09 e 4,6 NMP/g. Contaminação por coliformes totais foi detectada em 132 (81,5%) amostras e por coliformes termotolerantes em 107 (66%) amostras. *Escherichia coli* foi confirmada em 86 (53,1%) amostras, enquanto que 158 (96,7%) amostras apresentaram população de bactérias psicrotróficas maior que 5 log UFC/g. Os resultados obtidos entre os dois métodos desenvolvidos apresentaram pouca variação e todos os resultados foram concordantes considerando-se o intervalo de confiança de 95% da técnica do NMP (SWANSON; PETRAN; HANLIN, 2001). A PCR em tempo real foi otimizada com a preparação comercial ABSOLUTE™ QPCR SYBR® Green Mix (ABgene, Reino Unido) e os *primers* utilizados mostraram ser específicos para *L. monocytogenes*. As populações de microrganismos encontradas nestes alimentos indicaram a baixa qualidade microbiológica e evidenciaram a importância da implantação de programas para garantia da inocuidade de alimentos na cadeia produtiva das hortaliças minimamente processadas. A PCR em tempo real mostrou ser de fácil execução e diminuiu o tempo de obtenção de resultados para

pouco mais que 48 horas em comparação com o tempo gasto (7 dias) quando as hortaliças foram analisadas por meio do método convencional de cultivo.

Palavras-Chave: *Listeria monocytogenes*, hortaliças minimamente processadas, PCR em tempo real e avaliação microbiológica.

ABSTRACT

Oliveira M.A. **Evaluation of the microbiological safety of minimally processed vegetables by the enumeration of indicative microorganisms, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* by conventional methods and quantification of *Listeria monocytogenes* by real-time PCR.** 2008. 139p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Modern lifestyles have deeply changed eating habits worldwide, with an increasing demand for ready-to-eat foods, including minimally processed fruits and leafy greens. Packaging and storage conditions of these products may favor the growth of psychrotrophic bacteria, such as the pathogen *Listeria monocytogenes*. For microbiological risk assessment, it is crucial to generate quantitative data on foodborne pathogens, but the enumeration methods currently available are labor and time consuming. There is great interest in the development of reliable and fast methods for enumeration of *L. monocytogenes*, in order to shorten the time needed to obtain quantitative results. In this study 162, samples of leafy vegetables minimally processed were acquired at retail market in Ribeirão Preto from September, 2007 to August 2008 and they were analysed by conventional enumerating methods for total and thermophilic coliforms, *Escherichia coli* and psychrotrophic aerobic bacteria. Presence or absence of *Listeria* spp. was evaluated by immunoassay (Oxoid Listeria Rapid test) and detection of *Salmonella* was performed by conventional methods. Frozen aliquots of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* positive samples were quantitatively evaluated by conventional methods and *L. monocytogenes* was also enumerated by real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) with DNA primers based on 16S rRNA. Real-time PCR method was applied to analyze six artificially contaminated vegetables and the results obtained with this methodology were similar to the ones obtained with conventional most probable number (MPN) technique with a confidence interval of 95% (SWANSON; PETRAN; HANLIN, 2001). Of the 162 samples analyzed, *L. monocytogenes* was detected in one sample of collard green and in one mixed bunch of parsley plus spring onion (1.5×10^3 and 0.43 MPN/g, respectively). *Salmonella* sp was detected in two samples of common chicory with populations of 0.09 and 4.6 MPN/g. One hundred and thirty two samples (81.5%) showed contamination by total coliforms and 107 (66%) by thermophilic coliforms. *Escherichia coli* was confirmed in 86 (53.1%) samples while 156 (96.7%) showed populations of psychrotrophic bacteria above of 5 log CFU/g. PCR was optimized with a commercial preparation ABSOLUTE™ QPCR SYBR® Green Mix (ABgene, UK) and the primers utilized were specific for *L. monocytogenes*. These results showed the low microbiologic quality of minimally processed vegetables samples studied and indicate an urge for implementation of quality programs from producer to processors of these ready-to-eat foods. Real-time In comparison with the conventional culture method, real-time PCR was more easily performed and the time required to obtain the results was reduced to ca. 48 hours, in comparison with 7 days for conventional method.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, minimally processed vegetables, real-time PCR, microbiological quality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ilustração do imunoensaio Oxoid <i>Listeria Rapid Test</i> (OXOID, 2007, Basingstoke, England)	14
Figura 2.	Representação esquemática de detecção para PCR em tempo real - Sistema SYBR® Green. A. Corante livre em solução não emitindo fluorescência. B. Corante ligado ao DNA alvo, emitindo fluorescência (RASMUSSEN, 2006)	18
Figura 3.	Representação esquemática de detecção para PCR em tempo real – Sistema Sondas de Hibridização. A. Cada sonda é marcada com um corante fluróforo. B. As sondas anelam para o DNA alvo e a proximidade dos dois corantes permite a emissão de fluoreccência (RASMUSSEN, 2006)	19
Figura 4.	Representação esquemática de detecção para PCR em tempo real - Sistema TaqMan®. A. Taq DNA polymerase marcada com os corantes: <i>reporter</i> e <i>quencher</i> . Após a denaturação, os <i>primers</i> e a sonda anelam para o DNA alvo e a proximidade dos dois corantes não permite a emissão de fluorescência. B. Durante a fase de extensão, os corantes são separados, devido a hidrólise da sonda pela atividade exonuclease 5'→3' da Taq DNA polimerase, permitindo a emissão de fluorescência do <i>reporter</i> (RASMUSSEN, 2006).....	20
Figura 5.	Representação esquemática da técnica empregada para detecção de <i>Listeria</i> sp. em amostras de hortaliças minimamente processadas (OXOID, 2007)	32
Figura 6.	Representação esquemática do método empregado para quantificação de <i>L. monocytogenes</i> em hortaliças minimamente processadas (HITCHINS, 2003).	35
Figura 7.	Populações de bactérias aeróbias psicrotróficas em hortaliças minimamente processadas	46
Figura 8.	Comparação entre as médias das populações de bactérias aeróbias psicrotróficas (log UFC/g) encontradas nas hortaliças minimamente processadas analisadas e o tempo de prateleira (dias) no momento da análise	47
Figura 9.	Porcentagem de amostras positivas para <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Listeria innocua</i> por tipo de hortaliça minimante processada analisada	49
Figura 10.	Resultados da PCR em tempo real para estimativa do limite de detecção do método com <i>primer</i> 16S rRNA para pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> (WANG; CAO; JOHNSON, 1992): A. Curva de amplificação, B. Curva de dissociação, ■ 10 ⁵ cópias de DNA, ■ 10 ⁴ cópias de DNA, ■ 10 ³ cópias de DNA, ■ Branco, ■ <i>L. innocua</i>	50

Figura 11.	Curva padrão demonstrando a linearidade da PCR em tempo real. Diluições seriadas de extratos de DNA de <i>L. monocytogenes</i> (10^5 a 10^3 cópias de DNA)	50
Figura 12.	Gel de eletroforese dos <i>amplicons</i> das diluições seriadas dos extratos de DNA de <i>L. monocytogenes</i> obtidos por PCR em tempo real com <i>primer</i> 16S rRNA. Canaletas: 1. marcador de 50pb, 2. Branco e na sequência diluições dos extratos de 10^5 a 10^3 cópias de DNA	51
Figura 13.	Resultados da PCR em tempo real com <i>primer</i> 16S rRNA quanto à especificidade de <i>Listeria monocytogenes</i> (WANG; CAO; JOHNSON, 1992) em relação a outras espécies de <i>Listeria</i> . I. Curva de amplificação II. Curva de dissociação	51
Figura 14.	Gel de eletroforese dos <i>amplicons</i> dos extratos de DNA de diferentes espécies de <i>Listeria</i> e <i>L. monocytogenes</i> obtidos por PCR em tempo real com <i>primer</i> 16S rRNA. Canaletas: 1. marcador de 50pb, 2. Branco, de 3 a 11 DNA de <i>L. monocytogenes</i> e de 12 a 22 DNA de outras espécies de <i>Listeria</i>	52
Figura 15.	Resultados da PCR em tempo real com <i>primer</i> 16S rRNA quanto à especificidade de <i>Listeria monocytogenes</i> (WANG; CAO; JOHNSON, 1992) em relação a diferentes cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas: I. Curva de amplificação. II. Curva de dissociação	53
Figura 16.	Gel de eletroforese dos <i>amplicons</i> dos extratos de DNA de <i>L. monocytogenes</i> e outras bactérias Gram positivas e Gram negativas obtidos por PCR em tempo real com <i>primer</i> 16S rRNA. Canaletas: 1. marcador de 50pb, 2. DNA de <i>L. monocytogenes</i> , 3. Branco e de DNA das bactérias avaliadas no teste de especificidade. A. (4 a 11): ■ <i>Escherichia coli</i> , ■ <i>Citrobacter diversus</i> , ■ <i>Shigella sonnei</i> , ■ <i>Enterobacter aerogenes</i> , ■ <i>Staphylococcus aureus</i> , ■ <i>Salmonella Typhimurium</i> , ■ <i>Klebsiella pneumoniae</i> , ■ <i>Proteus mirabilis</i> . B. (12 a 16): ■ <i>Bacillus cereus</i> , ■ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , ■ <i>Enterococcus faecalis</i> , ■ <i>Staphylococcus epidermides</i> , ■ <i>Bacillus subtilis</i> . Resultados da PCR em tempo real quanto à especificidade de <i>Listeria monocytogenes</i> em relação a diferentes cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas	53
Figura 17.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de couve (H.21) refrigerada, naturalmente contaminada por <i>Listeria monocytogenes</i> : I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	55
Figura 18.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de couve (H.21c) congelada, naturalmente contaminada por <i>Listeria monocytogenes</i> : I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	56

Figura 19.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de cheiro-verde (H.23) refrigerado, naturalmente contaminado por <i>Listeria monocytogenes</i> : I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	56
Figura 20.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de cheiro-verde (H.23) refrigerado, naturalmente contaminado por <i>Listeria monocytogenes</i> : I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	57
Figura 21.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de alface (H.152) e cheiro-verde (H.156) sem inoculação por <i>Listeria monocytogenes</i> : I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	60
Figura 22.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de alface (H.152) artificialmente contaminado por <i>Listeria monocytogenes</i> , com nível de inoculação 10 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	60
Figura 23.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de alface (H.152) artificialmente contaminado por <i>Listeria monocytogenes</i> , com nível de inoculação 70 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	60
Figura 24.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de alface (H.152) artificialmente contaminado por <i>Listeria monocytogenes</i> , com nível de inoculação 424 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	61
Figura 25.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de cheiro-verde (H.156) artificialmente contaminado por <i>Listeria monocytogenes</i> , com nível de inoculação 12 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	61
Figura 26.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de cheiro-verde (H.156) artificialmente contaminado por <i>Listeria monocytogenes</i> , com nível de inoculação 116 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	61
Figura 27.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de cheiro-verde (H.156) artificialmente contaminado por <i>Listeria monocytogenes</i> , com nível de inoculação 1040 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	62

Figura 28.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de repolho (H.144) artificialmente contaminado por <i>Listeria monocytogenes</i> , com nível de inoculação 10 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	62
Figura 29.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de repolho (H.144) artificialmente contaminado por <i>Listeria monocytogenes</i> , com nível de inoculação 30 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	62
Figura 30.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de repolho (H.144) artificialmente contaminado por <i>Listeria monocytogenes</i> , com nível de inoculação 200 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	63
Figura 31.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de acelga (H.141) artificialmente contaminada por <i>Listeria monocytogenes</i> , com nível de inoculação 10 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	63
Figura 32.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de acelga (H.141) artificialmente contaminada por <i>Listeria monocytogenes</i> , com nível de inoculação 80 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	63
Figura 33.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de acelga (H.141) artificialmente contaminada por <i>Listeria monocytogenes</i> , com nível de inoculação 700 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	64
Figura 34.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de acelga (H.141) e repolho (H.144) sem inoculação por <i>Listeria monocytogenes</i> : I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	64
Figura 35.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de almeirão (H.160) artificialmente contaminada por <i>Listeria monocytogenes</i> , com nível de inoculação 10 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	64
Figura 36.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de almeirão (H.160) artificialmente contaminada por <i>Listeria monocytogenes</i> , com nível de inoculação 70 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	65

Figura 37.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de almeirão (H.160) artificialmente contaminada por <i>Listeria monocytogenes</i> , com nível de inoculação 880 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	65
Figura 38.	Resultados da alguns tubos de PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de almeirão (H.160) e couve (H.148) sem inoculação por <i>Listeria monocytogenes</i> : I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	65
Figura 39.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de couve (H.148) artificialmente contaminada por <i>Listeria monocytogenes</i> , com nível de inoculação 10 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	66
Figura 40.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de couve (H.148) artificialmente contaminada por <i>Listeria monocytogenes</i> , com nível de inoculação 46 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	66
Figura 41.	Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de couve (H.148) artificialmente contaminada por <i>Listeria monocytogenes</i> , com nível de inoculação 800 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação	66
Figura 42.	Comparação do tempo necessário para obtenção de resultados positivos e negativos por PCR em tempo real e método convencional de cultivo, para quantificação de <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos pela técnica do número mais provável (NMP)	67
Figura 43.	Comparação do gasto estimado necessário para a obtenção de resultados positivos e/ou negativos por PCR em tempo real e método convencional de cultivo, para quantificação de <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos pela técnica do número mais provável (NMP)	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Compilação de alguns trabalhos sobre a pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> por meio da PCR em tempo real	16
Tabela 2 -	Comparação entre a PCR convencional e a PCR em tempo real aplicadas à detecção e quantificação de bactérias patogênicas em alimentos.....	21
Tabela 3 -	Cepas de <i>Listeria</i> utilizadas neste estudo em análises de Presença/Ausência e quantificação de <i>Listeria</i> sp.....	29
Tabela 4 -	Cepas bacterianas utilizadas como controles nas técnicas convencionais realizadas para avaliação da qualidade microbiológica de amostras de hortaliças minimamente processadas e em testes de exclusividade para a técnica de PCR em tempo real.....	30
Tabela 5 -	Ocorrência de microrganismos indicadores de contaminação (coliformes totais, coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i>) em amostras de hortaliças minimamente processadas	45
Tabela 6 –	Resultado da quantificação de <i>L. monocytogenes</i> pela técnica do NMP (método convencional e PCR em tempo real) em amostras de hortaliças minimamente processadas naturalmente contaminadas	54
Tabela 7 –	Resultados da quantificação de <i>L. monocytogenes</i> por número mais provável (NMP) por método convencional de cultivo e PCR em tempo real com <i>primer</i> 16S r RNA, em amostras de hortaliças minimamente processadas e artificialmente contaminadas	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APT	Água Peptonada 1% Tamponada
ATCC	<i>American Typing Culture Collection and Prevention</i>
CDC	<i>Center for Diseases Control and Prevention</i>
CT	<i>Cycle Threshold</i>
CIP	<i>Collection Institut Pasteur</i>
BLEB	<i>Buffered Listeria Enrichment Broth</i>
BHI	Caldo Infusão de Cérebro e Coração
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (<i>Food and Agriculture Organization</i>)
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRET	Transferência de energia de ressonância fluorescente
ETA	Enfermidade Transmitida por alimento
FSIS	<i>Food Safety and Inspection Services</i>
H	Hortaliças
HE	Ágar Hektoen Enteric
IAL	Instituto Adolfo Lutz, SP
IALRP	Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LIA	Ágar Lisina Ferro
NMP	Número Mais Provável
NaOH	Hidróxido de sódio
OX	Ágar Oxford
PAL	Ágar Palcam
PBS	Salina Fosfatada Tamponada (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
RV	Caldo Rappaport Vassiliadis
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TAE	Tris-base, EDTA e acetato de sódio
T _m	Temperatura de fusão (<i>melting temperature</i>)

TP	Tampão Fosfato
TSAYE	Ágar Trypticase de soja adicionado de extrato de levedura
TSBYE	Caldo Trypticase Soja adicionado de extrato de levedura
TSI	Ágar Ferro Tríplice Açúcar
TT	Caldo Tetracionato
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
XLD	Ágar Xilose Lisina Desoxicolato
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	3
1.2. Listeriose.....	5
1.3. Hortaliças minimamente processadas	7
1.4. Análise de risco microbiológico em alimentos.....	9
1.5. Métodos de detecção e quantificação de <i>Listeria</i> sp. e <i>L. monocytogenes</i> em alimentos	11
1. 5.1. Método convencional de detecção e quantificação	12
1. 5. 2. Métodos rápidos	12
1.5.2.1. Métodos imunológicos.....	12
1.5.2.2. Métodos baseados em biologia molecular	14
1.6. <i>Salmonella</i> SP.....	22
1.7. Microrganismos indicadores de contaminação.....	23
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Material.....	28
3.1.1. Amostras de alimentos e amostragem	28

3.1.2. Coleta das amostras de hortaliças minimamente processadas.....	28
3.1.3. Cepas bacterianas	29
3.2. Métodos.....	30
3.2.1. Culturas puras e contaminação artificial de amostras	30
3.2.2. Pesquisa de <i>Listeria</i> sp. por imunoensaio	30
3.2.3. Quantificação de <i>L. monocytogenes</i> por método convencional	33
3.2.4. Quantificação de <i>L. monocytogenes</i> por PCR em tempo real.....	36
3.2.4.1. Inoculação das amostras de hortaliças minimamente processadas.....	36
3.2.4.2. Preparação do DNA	36
3.2.4.3. Otimização do ensaio de PCR em tempo real.....	37
3.2.4.4. Análise Estatística	39
3.2.5. Avaliação da qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas	39
3.2.5.1. Pesquisa de <i>Salmonella</i> SP	39
3.2.5.2. Quantificação de <i>Salmonella</i> sp	41
3.2.5.3. Enumeração de microrganismos indicadores.....	41
3.2.5.4. Comparação dos resultados obtidos nos ensaios realizados para a avaliação da qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Avaliação da qualidade microbiológica das hortaliças minimamente processadas analisadas	44
4.2. Detecção de <i>Listeria</i> sp por imunoensaio (<i>Listeria Rapid Test Oxoid</i>)	48
4.3. Quantificação de <i>L. monocytogenes</i> por PCR em tempo real em hortaliças minimamente processadas.....	49

4.4. Quantificação das amostras naturalmente contaminadas por <i>L. monocytogenes</i> (método convencional de cultivo e PCR em tempo real).....	54
4.5. Quantificação das amostras artificialmente contaminadas por <i>L. monocytogenes</i> (método convencional de cultivo e PCR em tempo real).....	58
4.6. Comparação entre o método convencional de cultivo e PCR em tempo real utilizados na quantificação de <i>L. monocytogenes</i> em hortaliças minimamente processadas.....	67
5. DISCUSSÃO	69
5.1. Avaliação da qualidade microbiológica das hortaliças minimamente processadas	70
5.2. Ocorrência de <i>Listeria</i> sp. nas amostras de hortaliças minimamente processadas	73
5.3. Quantificação das amostras de hortaliças minimamente processadas, naturalmente e artificialmente contaminadas por <i>L. monocytogenes</i> por método convencional de cultivo (NMP/g)	75
5.4. Quantificação das amostras de hortaliças minimamente processadas, naturalmente e artificialmente contaminadas por <i>L. monocytogenes</i> por PCR em tempo real (NMP/g)	76
5.5. Comparação entre a PCR em tempo real e o método convencional de cultivo utilizados para enumeração de <i>L. monocytogenes</i> em hortaliças minimamente processadas.....	81
6. CONCLUSÕES	83

7. REFERÊNCIAS.....	85
----------------------------	-----------

APÊNDICES	99
------------------------	-----------

APÊNDICE A – Tabela dos resultados das análises microbiológicas de amostras de hortaliças minimamente processadas	100
---	-----

APÊNDICE B – Tabelas de NMP do método convencional e PCR em tempo real aplicados na quantificação de <i>L. monocytogenes</i> em hortaliças minimamente processadas.....	105
---	-----

1. INTRODUÇÃO

Doenças causadas por agentes patogênicos transmitidos por alimentos constituem um sério problema de saúde pública, sendo responsável por grande impacto na economia mundial (KENNEDY; WALL, 2007; MENG; DOYLE, 2002).

Vários fatores são considerados relevantes na avaliação do risco da ocorrência de surtos ocasionados por alimentos. Dentre eles estão as transformações sócio-econômicas, globalização do mercado de alimentos e transformações no estilo de vida da população, destacando-se o aumento do número de refeições coletivas e a preferência dos consumidores por produtos minimamente processados e “prontos para o consumo” (KENNEDY; WALL, 2007).

Os alimentos minimamente processados e mantidos sob refrigeração podem oferecer condições favoráveis para a sobrevivência e/ou multiplicação de microrganismos patogênicos, tais como *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. *Salmonella* sp. é um patógeno de grande importância em saúde pública por causar grandes surtos, muitos dos quais com caráter epidêmico. *L. monocytogenes* é uma bactéria psicrófila, causadora da listeriose, doença atípica, que apresenta baixa morbidade e alta letalidade (ABADIAS et al., 2008; AGUADO; VITAS; GARCÍA-JALÓN, 2004).

A dose infecciosa mínima de *L. monocytogenes* para humanos, ainda não foi estabelecida, dificultando a avaliação do risco do consumo de alimentos contaminados por este patógeno. Além disso, existem poucos dados sobre a quantificação de *L. monocytogenes* em alimentos (NØRUNG et al., 2000).

O método convencional de quantificação de *L. monocytogenes* é trabalhoso, moroso e de alto custo, sendo necessárias pesquisas para o desenvolvimento de métodos rápidos, eficientes, sensíveis e de custo adequado para enumeração deste

patógeno em alimentos (BERRADA et al., 2006; CHURCHILL; LEE; HALL, 2006; DE MARTINIS; DUVALL; HITCHINS, 2007; RODRÍGUES-LÁZARO et al., 2007).

1.1. *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* sp. é formado por bacilos Gram positivos, que podem apresentar-se em unidades ou em pequenas cadeias, medem 0,4 µm de diâmetro e 1 a 1,5 µm de comprimento, não formam esporos, produzem catalase, mas não oxidase. *Listeria* sp. é móvel a 25°C, apresentando resultado típico em meio de motilidade, em forma de “guarda-chuva” (HITCHINS, 2003; RYSER; DONNELLY, 2001).

A classificação do gênero *Listeria* é baseada em resultados de testes de hibridização de DNA-DNA, eletroforese de enzimas multilocos e seqüenciamento de 16S rRNA. São reconhecidas seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* (subespécie *ivanovii* e subespécie *londoniensis*), *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. grayi* (ALLERBERGER, 2003; BILLE; ROCOURT; SWAMINATHAN, 2000; RYSER; DONNELLY, 2001; SWAMINATHAN, 2001).

As espécies *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são consideradas patogênicas e ambas são ocasionalmente responsáveis pela ocorrência de aborto em animais. *L. monocytogenes* é a espécie de maior interesse em saúde pública, por causar doença em humanos (BILLE; ROCOURT; SWAMINATHAN, 2000; COSSART, 2007; DONNELLY, 2001). Entretanto, algumas publicações evidenciam a patogenicidade de outras espécies de *Listeria* (PERRIN; BEMER; DELAMARE, 2003; SNAPIR; VAISBEIN; NASSAR, 2006).

L. monocytogenes é ubiqüitária, amplamente distribuída no ambiente, sendo comumente encontrada em solo, água, material vegetal em decomposição, esgoto e

plantas (BEUCHAT, 1996; GIACCONE; OTTAVIANI, 2007; McLAUCHLIN et al., 2004; SWAMINATHAN, 2001). *L. monocytogenes* já foi isolada de várias espécies de animais domésticos e silvestres, aves e de algumas espécies de peixes (HOF, 2003). Apesar de não ser esporogênica, *L. monocytogenes* é altamente resistente a condições ambientais adversas, tais como altas concentrações de cloreto de sódio e pH ácido. Além disso, suporta repetidos congelamentos e descongelamentos (GIACCONE; OTTAVIANI, 2007; NØRUNG, 2000; ROCOURT; BILLE, 1997).

L. monocytogenes pode colonizar superfícies de equipamentos de processamento de alimentos e formar biofilmes que podem facilitar a sua disseminação nos alimentos (AGUADO; VITAS; GARCÍA-JALÓN, 2004; ELLS; HANSEN, 2006; GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005). Devido a falhas no processamento ou à contaminação cruzada pós-processamento, esta bactéria pode contaminar produtos alimentícios prontos para o consumo ("ready-to-eat" - RTE), incluindo frutas e hortaliças (AGUADO; VITAS; GARCÍA-JALÓN, 2004).

L. monocytogenes possui 13 sorotipos definidos com base em antígenos somáticos (O) e flagelares (H), porém cerca de 95% dos isolados de humanos são dos sorotipos 4b, 1/2a e 1/2b, sendo o sorotipo 4b o mais frequentemente isolado em surtos (ALLERBERGER, 2003; DONNELLY, 2001; GRAY et al., 2004; SEELIGER; JONES, 1989; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007b).

No Brasil, Hofer, Reis e Hofer (2006) realizaram a análise fenotípica de 255 isolados do gênero *Listeria* provenientes de materiais clínicos de diversos estados do país, no período de 1969 a 2006. Naquele estudo, os autores observaram a predominância dos sorovares 4b em 154 (60,3%) e 1/2a em 74 (29%) das cepas caracterizadas.

Segundo Rocourt, Jacquet e Reilly (2000), de 2 a 10% da população humana pode ser portadora de *L. monocytogenes*. Nos EUA, de todos os patógenos veiculados por alimentos rastreados em 2000, *L. monocytogenes* foi responsável pela segunda maior taxa de mortalidade (21%), com a maior taxa de hospitalização (90,5%). Estima-se que nos EUA, a cada ano, *L. monocytogenes* seja responsável por aproximadamente 2.500 casos graves de listeriose, com cerca de 500 casos fatais (FDA/FSIS, 2003).

1.2. Listeriose

L. monocytogenes causa a doença denominada listeriose, que é clinicamente definida quando a bactéria é isolada de secreções respiratórias, aspirados gástricos, mecônio do neonato e outras fontes, normalmente estéreis, como sangue, placenta e líquido céfalo raquidiano (BILLE; ROCOURT; SWAMINATHAN, 2000; RYSER; DONNELLY, 2001).

A listeriose acomete principalmente gestantes, recém-nascidos, idosos, indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida, cirrose, carcinoma, e outras doenças que causam deficiência do sistema imunológico. Pode ser grave, com comprometimento do sistema nervoso central (meningite, encefalite) e septicemia. Na forma mais branda, pode manifestar-se com sintomas de gripe e febre, bem como gastroenterite autolimitada e não invasiva (BERRADA et al., 2006; DONNELLY, 2001; GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005).

L. monocytogenes pode ser transmitida por via placentária da mãe para o feto e ocasionar infecção na criança em gestação. O terceiro trimestre de gravidez é o período de maior susceptibilidade à doença e podem ocorrer abortos, nascimentos

prematturos ou a morte fetal. (ABRAM et al., 2003; BAKARDJIEV; THERIOT; PORTNOY, 2006; ROSSMANITH et al., 2006).

O primeiro relato de listeriose provavelmente envolvendo a transmissão de *L. monocytogenes* por alimentos, data de 1979, quando ocorreu um surto de listeriose em um hospital de Boston/EUA. *L. monocytogenes* foi isolada de 20 (87%) amostras dos 23 pacientes envolvidos, sendo que evidências epidemiológicas sugeriram associação com o consumo de vegetais preparados no hospital (GAHAN; HILL, 2005).

Na década de 80, a listeriose emergiu como uma enfermidade comprovadamente causada por alimentos contaminados com *L. monocytogenes*, com vários surtos nos Estados Unidos, Canadá e Europa (GAHAN; HILL, 2005; SWAMINATHAN, 2001).

O primeiro surto em que *L. monocytogenes* foi comprovadamente incriminada como o agente causal foi relatado no Canadá, em 1981, envolvendo 41 pacientes (sete adultos e 34 crianças), com uma taxa de letalidade para crianças nascidas vivas de 27%. O alimento incriminado naquele surto foi salada de repolho tipo *coleslaw*, preparada com repolho produzido em uma fazenda, na qual se utilizava como fertilizante esterco proveniente de carneiros que apresentaram meningite causada por *L. monocytogenes* (SCHLECH III et al., 1983).

Desde então, vários surtos foram relatados na América do Norte e Europa, principalmente envolvendo leite (pasteurizado ou não), queijos, sorvetes, carne de frango crua ou cozida, embutidos cárneos e peixes crus ou defumados (DONNELLY, 2001; HOF, 2003).

No Brasil existem vários estudos sobre a ocorrência de *L. monocytogenes* em alimentos, equipamentos e ambiente de processamento de alimentos. Contudo, não

há relato de surto ou caso esporádico em que um alimento tenha sido considerado o veículo de transmissão deste patógeno.

1.3. Hortaliças minimamente processadas

Com a expansão de redes de *fast food* a partir da década de 70, frutas e hortaliças minimamente processadas passaram a ter grande relevância nos EUA, (MORETTI, 2007).

No Brasil, a comercialização de frutas e hortaliças minimamente processadas iniciou-se na década de 90 e, a sua aceitação pelos consumidores vem aumentando anualmente, apesar de ainda serem poucos os fornecedores destes produtos, e os preços de venda muito superiores aos produtos *in natura* (SILVA et al., 2004).

Frutas e hortaliças minimamente processadas representam uma parcela considerável no mercado antes ocupado por produtos *in natura*. Esta mudança pode ser atribuída à preferência do consumidor devido à diminuição do tempo necessário para o preparo, padronização na forma e tamanho das frutas e hortaliças e redução da geração de resíduos (MORETTI, 2007; VILELA; HENZ, 2000).

O processamento mínimo de frutas e hortaliças inclui operações de seleção, lavagem, descascamento, corte, sanitização, enxágüe, secagem, seleção e embalagem realizadas de modo a obter-se um produto fresco, com vida de prateleira prolongada, mantendo a qualidade nutritiva e sensorial (FRANCIS; THOMAS; O'BEIRNE, 1999). No entanto, existe certa dificuldade em manter estas características, uma vez que o processamento provoca injúrias mecânicas ao revestimento natural dos vegetais, levando-os à perda de água, escurecimento e esbranquiçamento (SOARES; GERALDINE, 2007).

O tecido vegetal danificado produz rapidamente um sinal de estresse que pode ser o responsável pela indução de várias respostas fisiológicas, tais como aumento da respiração e produção de etileno. O corte do tecido remove a proteção natural da epiderme e destrói a compartimentalização que separa as enzimas de seus respectivos substratos nas células diretamente afetadas. A liberação destas enzimas intracelulares favorece reações que diminuem drasticamente a vida útil do produto, podendo favorecer a multiplicação de microrganismos (BRECHT et al., 2007; SILVA et al., 2004).

A embalagem contribui para proteger as hortaliças minimamente processadas de danos físicos durante o transporte e armazenamento, contaminação por microrganismos, insetos e roedores. Além disso, os produtos podem ser acondicionados em atmosfera modificada, para a extensão da vida de prateleira (SOARES; GERALDINE, 2007).

Muitos tipos de filmes plásticos estão disponíveis no mercado para uso em produtos minimamente processados e uma embalagem inadequada poderá afetar a vida de prateleira do produto, provocar modificações na atmosfera interna, aumentar o teor de umidade e permitir uma rápida deterioração (FANTUZZI; PUSCHMANN; VANETTI, 2004; SOARES; GERALDINE, 2007).

Há grande potencial para contaminação microbiológica de frutas e hortaliças, principalmente, devido à falta de boas práticas durante o cultivo, colheita, manuseio e distribuição. A contaminação de hortaliças ainda pode ser agravada pela irrigação com águas não tratadas e/ou utilização de fertilizantes orgânicos inadequados (FRANCIS; THOMAS; O'BEIRNE, 1999).

Na superfície de vegetais recém colhidos, muitos microrganismos podem aderir-se: *Citrobacter freundii*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Escherichia coli*

enteropatogênica, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e *L. monocytogenes* (BRACKETT; SPLITTSTOESSER, 2001).

Cabe destacar que o armazenamento de frutas e hortaliças minimamente processadas em baixas temperaturas pode aumentar a vida de prateleira e retardar processos de deterioração, mas não impede a multiplicação de microrganismos psicrotróficos como *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Aeromonas hydrophila* (FRANCIS; THOMAS; O'BEIRNE, 1999; VANETTI, 2007).

Alguns estudos têm comprovado a presença e a capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* em frutas e hortaliças *in natura* e/ou minimamente processadas, mostrando que estes produtos são potenciais veiculadores de bactérias patogênicas (ELLS; HANSEN, 2006; JOHANNESSEN; LONCAREVIC; KRUSE, 2002).

1.4. Análise de risco microbiológico de alimentos

A análise de risco é um dos instrumentos utilizados para garantir a inocuidade de alimentos. Risco é definido como a estimativa da probabilidade de ocorrer um perigo em particular, em um determinado tipo de alimento e para um grupo específico de consumidores, englobando todos os produtos similares disponíveis no mercado, em uma mesma categoria (OLIVEIRA; FRANCO, 2003; SPERBER, 2001).

Na avaliação editada por *Food and Drug Administration/Food Safety and Inspection Services* (FDA/FSIS, 2003) sobre o risco para a saúde relativa a listeriose transmitida por alimentos, foram destacadas 20 categorias de alimentos de maior risco, com ênfase para alimentos prontos para o consumo e armazenados sob refrigeração por longos períodos.

Análise de risco é um processo científico de compilação e análise de dados, que consiste de três componentes: avaliação de risco, gestão de risco e comunicação do risco. A avaliação de risco é um processo científico estruturado que envolve a identificação do perigo, caracterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco. Gestão de risco é um processo que combina ciência, política, economia e outros fatores que levam à tomada de decisões sobre as medidas apropriadas para proteger a saúde do consumidor. Comunicação do risco é um processo social que promove diálogo entre profissionais responsáveis pela análise de risco, consumidores e demais partes interessadas em informações a respeito do risco e sua gestão (JOUVE, 2007; LAMMERDING; FAZIL; PAOLI, 2001; OLIVEIRA; FRANCO, 2003).

Dados sobre a enumeração de patógenos em alimentos são uma das ferramentas utilizadas nos processo de análise de risco (FDA/FIS, 2003). Resultados sobre a população de *L. monocytogenes* em alimentos, em especial produtos prontos para o consumo, refrigerados ou congelados ainda são escassos, destacando-se a importância da realização de mais estudos para quantificação deste patógeno em alimentos (CHEN et al., 2006; FDA/FIS, 2003; WHO/FAO, 2004).

No Brasil, a ocorrência de *Listeria* sp. em material clínico, alimentos, ambiente e equipamentos de processamento de alimentos tem sido estudada, mas poucos são os estudos de quantificação deste microrganismo em alimentos (ARAGON-ALEGRO, 2005; DESTRO; SERRANO; KABUKI, 1991; FRÖDER et al., 2007; MOURA; DESTRO; FRANCO, 1993; SOUZA et al., 2008).

Sakate et al. (2003) quantificaram *L. monocytogenes* em 45 amostras de salames fatiados embalados a vácuo, refrigerados e comercializados na cidade de

São Paulo, detectando contaminação por este microrganismo em 3 (6,7%) amostras (população de 9,2 NMP/g para todas as amostras positivas).

Alves et al. (2005) quantificaram *L. monocytogenes* em 73 amostras de surubim fresco e defumado, obtendo 3 (5,2%) amostras positivas, cujas populações de *L. monocytogenes* foram de 1,5 e 0,93 NMP/g para as amostras colhidas dentro de 24 horas e, de 0,04 NMP/g para as amostras colhidas após armazenamento por 35 dias a 5°C.

A quantificação de *L. monocytogenes* em alimentos pode contribuir para aperfeiçoar as políticas de controle deste patógeno em alimentos, resultando em ações que protejam a saúde dos consumidores.

1.5. Métodos de detecção e quantificação de *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* em alimentos

Uma extensa variedade de métodos pode ser utilizada para a detecção e quantificação de espécies de *Listeria* em alimentos (GIACCONE; OTTAVIANI, 2007)

O isolamento de *Listeria* sp. de alimentos, ambiente e equipamentos de indústrias alimentícias depende da capacidade do método em promover a multiplicação de baixos números de células potencialmente injuriadas e ao mesmo tempo, minimizar a multiplicação de outros microrganismos (RYSER; DONNELLY, 2001).

O método ideal para pesquisa de *L. monocytogenes* deve ser de fácil execução, permitir detectar baixas populações (1 UFC/g do produto), apresentar alta especificidade, fornecer resultados rápidos, ser adequado para automação e de baixo custo (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005; INGIANNI et al., 2001; NORTON, 2002; OTERO; GARCÍA-LÓPEZ; MORENO, 1998).

1.5.1. Método convencional de detecção e quantificação

A quantificação de populações de *L. monocytogenes* abaixo de 10^2 UFC/g nos alimentos requer a utilização da técnica do Número Mais Provável (NMP) (SWANSON; PETRAN; HANLIN, 2001). Este método envolve a realização de uma etapa de enriquecimento primário, com uma série de diluições, seguido de enriquecimento secundário e semeadura em placas contendo meios seletivos e diferenciais. As colônias suspeitas são submetidas à purificação e realização de provas bioquímicas para a identificação da espécie, podendo demorar sete dias ou mais para se obter um resultado positivo (BERRADA et al., 2006; CHURCHILL; LEE; HALL, 2006; DE MARTINIS; DUVALL; HITCHINS, 2007; DUVALL et al, 2006).

1.5.2. Métodos rápidos

Atualmente, há muitos métodos alternativos para a pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos. Contudo, etapas de pré-enriquecimento são ainda necessárias para assegurar a detecção de pequenas populações da bactéria. Além disso, resultados positivos obtidos por métodos rápidos são considerados presuntivos e devem ser confirmados pelo método convencional (NORTON, 2002; SWAMINATHAN, 2007a).

A obtenção de resultados rápidos possibilita a rápida tomada de decisões, como comercialização de produtos perecíveis, correções nos pontos críticos de processamento do alimento ou a retirada do lote do comércio (BARBUTI et al, 2000).

1.5.2.1. Métodos imunológicos

Testes imunológicos têm sido utilizados para a detecção de microrganismos há décadas e são baseados na reação de antígenos com anticorpos mono ou

policlonais. Não há necessidade de utilização de instrumentos caros, os resultados são relativamente fáceis de interpretar e há boa especificidade (CHURCHILL; LEE; HALL, 2006; ENTIS, et al., 2001; OTERO; GARCÍA-LÓPEZ; MORENO, 1998; RYSER; DONNELLY, 2001; SWAMINATHAN, 2007a).

Estudos realizados por Aragon-Alegro et al. (2005), Feldsine et al. (2002b) Kerdahi e Istafanos (2000), Rodrigues, Landgraf e Destro (2002) e Silbernagel et al. (2004) utilizando ensaios imunológicos para a detecção de *Listeria* sp. em alimentos, ambiente e equipamentos de fábricas processadoras de alimentos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas frente ao método convencional.

Uma forma de apresentação de testes que empregam imunocromatografia/imunoprecipitação é mostrada na Figura 1 (*Listeria Rapid Test – Oxoid*). Neste teste é empregado anticorpo monoclonal específico para o antígeno flagelar B de diferentes espécies de *Listeria* (exceto *L. grayi*). São necessários dois enriquecimentos seletivos sequenciais (de 21 horas cada) para a máxima recuperação e multiplicação de *Listeria* sp. Este teste possui um aparato com três janelas. Na janela amostra, a qual contém látex azul impregnado com anticorpo monoclonal anti-antígeno flagelar B de *Listeria* são colocados 135 µL da amostra enriquecida, que por capilaridade, migra até o meio da janela resultado do teste que contém uma linha de anticorpos anti-anticorpos flagelares de *Listeria* imobilizados. A migração por capilaridade continua até a janela controle do teste. Uma reação entre o complexo (Anticorpo – Antígeno - Anticorpo) resulta em uma linha azul na janela resultado (positivo). Se não houver antígeno presente, a janela resultado permanecerá clara (negativa) (OXOID, 2007).

Figura 1. Ilustração do imunoensaio Oxoid *Listeria Rapid Test* (OXOID, 2007, Basingstoke, England)

1.5.2.2. Métodos baseados em biologia molecular

Reação de polimerase em cadeia (PCR)

Uma técnica de biologia molecular de ampla aplicação para a pesquisa de microrganismos em alimentos é a PCR, que envolve a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença de uma enzima DNA polimerase. Está baseada no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores (*primers*), que delimitam a sequência do DNA alvo da amplificação. Estes *primers* são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares às seqüências específicas da região alvo (CHURCHILL; LEE; HALL, 2006; GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005).

O ciclo da PCR envolve três etapas: (i) desnaturação do DNA molde em fita simples, pela elevação da temperatura para aproximadamente 95°C; (ii) anelamento, pela redução rápida da temperatura para 35 a 60°C, dependendo do tamanho e da seqüência do *primer* utilizado, permitindo a hibridização de cada *primer* com as seqüências complementares da região alvo; (iii) extensão, quando a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos *primers* (CHURCHILL; LEE; HALL, 2006; FARBER, 1996).

Varias técnicas são utilizadas para a detecção dos produtos de amplificação da PCR convencional, tais como eletroforese em gel de agarose, com a utilização do

corante brometo de etídio, posterior visualização em transluminador com luz UV e fotodocumentação (NORTON, 2002; SWAMINATHAN, 2007a).

Muitos artigos foram publicados sobre a detecção de *L. monocytogenes* por PCR, com a utilização de *primers* direcionados a genes que codificam fatores de virulência, tais como gene *hly* – que codifica *listeriolisina* O (THIMOTHE, et al., 2004), gene *iap* – que codifica proteína relacionada à invasão (NIEDERHAUSER, 1992) e gene *inlAB* – que codifica internalina (JUNG et al., 2003).

Em alguns artigos foi descrita a pesquisa de *L. monocytogenes* pelo uso da PCR e de *primers* de DNA baseados em 16S rRNA (BERRADA et al., 2006; SOMMER; KASHI, 2003; WANG; CAO; JOHNSON, 1992). Em geral, é possível otimizar a sensibilidade de testes de PCR pela utilização de *primers* direcionados a genes que codificam rRNA, pois para produzir quantidades adequadas de ribossomos, as células contêm múltiplas cópias dos genes de rRNA (SOMER; KASHI, 2003).

PCR em tempo real

Segundo Rodrigues-Lázaro et al. (2007) a enumeração de microrganismos patogênicos em alimentos é um dos principais aspectos da microbiologia molecular e, a PCR em tempo real é um ensaio promissor, principalmente quando se deseja obter resultados que serão úteis na avaliação quantitativa de risco microbiológico.

PCR em tempo real é uma técnica de PCR que utiliza uma sonda com marcador fluorescente ou um corante intercalante, que permite visualizar o processo de amplificação em tempo real. O resultado da análise é apresentado como CT (do inglês, *Cycle Threshold*), que significa o primeiro ciclo de amplificação no qual há aumento significativo de fluorescência acima do sinal de fundo. Pode-se também

determinar o perfil de estabilidade térmica do produto formado (curva de fusão do *amplicon*) (JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003; SWAMINATHAN, 2007a).

A obtenção de resultados em tempo real é uma das grandes vantagens da PCR em tempo real em relação à PCR convencional que requer um tempo grande de análise com uma manipulação intensiva e trabalhosa pós-PCR e, o uso de reagentes químicos tóxicos aumenta o risco potencial de contaminação do laboratório (GIULIETTI et al., 2001; HEID et al., 1996).

Na Tabela 1 estão compilados alguns trabalhos sobre a pesquisa de *L. monocytogenes* por PCR em tempo real.

Tabela 1 - Compilação de alguns trabalhos sobre a pesquisa de *L. monocytogenes* por meio da PCR em tempo real

Autores	Gene alvo	Primer ou sonda	Seqüência do primer
HOUGH et al., 2002	<i>hly</i>	F R (sonda)	5'-GGGAAATCTGTCTCAGGTGATGT-3' 5'-CGATGATTTGAACTTCATCTTTTGC-3' 5'-6FAM)CAAAAATTCTTCCTTCAAAGC CGTAATTTACGG(TAMRA)-3'
JOTHIKUMAR; WANG; GRIFFITHS, 2003	<i>hly</i>	LF LR	M24199 5'-TCCGCAAAAGATGAAGTTC-3' M24199 5'-ACTCCTGGTGTTTCTCGATT-3'
HITCHINS et al., 2004	<i>iap</i>	835F 918 (sonda) 998R	X52268 5'-AACTGGTTTCGTTAACGGTAAATAC TTA-3' X52268 5'-(ROX)CTACTACTCAACAAGCTGCAC CTGCTGC(BHQ2)3' X52268 5'-TAGGCGCAGGTGTAGTTGCT-3'
RODRÍGUES- LÁZARO; HERNÁNDEZ; PLA, 2004	<i>prf</i>	F R	5'-GATACAGAAACATCGGTTGGA-3' 5'-GTGTAATCTTGATGCCATCAGG-3'
O'GRADY et al., 2008	<i>ssr</i>	LF LR	5'-GCATCGCCCATGTGCTAC-3' 5'-TCTACGAGCGTAGTCACCG-3'
RANTSIOU et al., 2008	16S- 23S	IGS 1 IGS 2	5'-GGCCTATAGCTCAGCTGGTTA-3' 5'-GCTGAGCTAAGGCCCGTAAA-3'

Atualmente existem sistemas sofisticados capazes de quantificar os produtos da PCR em tempo real, tais com molecular *beacons*, *scorpions*, sonda TaqMan®, sondas de hibridização e o corante intercalante SYBR® Green I. Três desses sistemas de detecção de DNA estão representados nas Figuras 2, 3 e 4 (GIULIETTI et al., 2001).

O SYBR® Green I (Figura 2) é um corante que se liga ao DNA dupla fita e com a excitação de luz emitida por um sistema ótico, emite fluorescência verde. O aumento da fluorescência após cada ciclo permite a quantificação direta do DNA alvo (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005; SWAMINATHAN, 2007a).

A utilização de SYBR® Green pode ser vantajosa porque este corante liga-se a qualquer DNA dupla fita, tornando desnecessária a utilização de sondas, o que permite diminuir o tempo e o custo das análises. Por outro lado, se houver a formação de DNA dupla fita não específico e dímero de primers, também ocorrerá a ligação de SYBR® Green e aumento da fluorescência (GIULIETTI et al., 2001; RASMUSSEN, 2006; SWAMINATHAN, 2007a).

Esse problema em potencial pode ser evitado com uma otimização cuidadosa da PCR para reduzir a formação de dímeros de *primers*. A avaliação de curvas de fusão também pode auxiliar na determinação específica do produto desejado. A temperatura de fusão (*melting temperature* – T_m) é a temperatura na qual 50% das moléculas de DNA estão como fita simples e 50% estão ligadas às seqüências complementares (RASMUSSEN, 2006).

Figura 2. Representação esquemática de detecção para PCR em tempo real - Sistema SYBR® Green. **A.** Corante livre em solução não emitindo fluorescência. **B.** Corante ligado ao DNA alvo, emitindo fluorescência (RASMUSSEN, 2006).

A PCR em tempo real também pode ser realizada utilizando-se sondas duplamente marcadas, as quais, baseado no princípio da transferência de energia de ressonância fluorescente (FRET) emitem sinais de fluorescência apenas quando clivadas (GIULIETTI et al., 2001). Neste caso, duas sondas são escolhidas para hibridizar lado a lado no produto da PCR (Figura 3). Neste sistema são utilizados quatro oligonucleotídeos (dois *primers* e duas sondas marcadas com corantes fluóforos) e, cada sonda é marcada com um único corante. A sonda da posição 3' é marcada com um corante fluóforo, que age como um doador de energia fluorescente e, a posição terminal 5' da outra sonda é marcada com um corante fluóforo que age como um receptor de energia fluorescente. As seqüências das duas sondas são selecionadas para que possam hibridizar com a seqüência alvo em uma posição que os corantes fiquem muito próximos, permitindo que ocorra o princípio de FRET. O corante doador da sonda marcada na posição 3' transfere energia, permitindo que o corante receptor da sonda marcada na posição 5' emita fluorescência em um diferente comprimento de onda.

O sinal de fluorescência pela transferência de energia de ressonância só é observado quando dois eventos específicos de hibridização ocorrem, ou seja, as sondas anelam para o DNA alvo e a proximidade dos dois corantes permite a emissão de fluorescência. A medida da fluorescência é realizada após a etapa de anelamento (GIULIETTI et al., 2001).

Figura 3. Representação esquemática de detecção para PCR em tempo real – Sistema Sondas de Hibridização. **A.** Cada sonda é marcada com um corante fluoróforo (■ doador e ■ receptor de energia fluorescente). **B.** As sondas anelam para o DNA alvo e a proximidade dos dois corantes permite a emissão de fluorescência (RASMUSSEN, 2006).

Na Figura 4 está ilustrado como é gerado o sinal de fluorescência quando se utilizam sondas de hidrólise ou TaqMan[®]. Neste sistema são utilizados três oligonucleotídeos (dois *primers* e uma sonda marcada com dois diferentes corantes fluorescentes) específicos para o DNA alvo e que são capazes de ligarem-se entre si. A eficiência deste ensaio é dependente da atividade exonuclease 5'→3' da Taq DNA polimerase. A sonda TaqMan[®] é marcada na extremidade terminal 5' com um fluoróforo (*reporter*) e na extremidade terminal 3' com um *quencher*. Quando a sonda está intacta, devido à proximidade dos dois corantes ocorre o princípio de FRET e o corante *quencher* absorve energia emitida pelo corante *reporter*. Durante a PCR em tempo real, a sonda TaqMan[®] hibridiza com a sequência da fita simples do DNA complementar alvo. Na amplificação, a sonda TaqMan[®] é hidrolisada pela atividade exonuclease 5'→3' da Taq DNA polimerase, separando os corantes fluorescentes

(*quencher e reporter*) durante a extensão. Devido a esta separação, a emissão de energia do corante *reporter* para o corante *quencher* diminui resultando em um aumento na intensidade da emissão de fluorescência do corante *reporter* que é medida ciclo a ciclo (GIULIETTI et al., 2001; HEID et al., 1996; NORTON, 2002; RASMUSSEN, 2006; SWAMINATHAN, 2007a).

Sondas de hibridização e sondas TaqMan[®] são muito utilizadas para aumentar a especificidade na detecção da PCR em tempo real, por serem capazes de promover a detecção de um produto específico da PCR (HEID et al., 1996). Segundo Swaminathan (2007a) apesar dos resultados obtidos serem mais específicos, a utilização de sondas de hibridização tem um custo maior e sua manipulação é complexa.

Figura 4. Representação esquemática de detecção para PCR em tempo real - Sistema TaqMan[®]. **A.** Taq DNA polymerase marcada com os corantes ■ *reporter* e ■ *quencher*. Após a denaturação, os *primers* e a sonda anelam para o DNA alvo e a proximidade dos dois corantes não permite a emissão de fluorescência. **B.** Durante a fase de extensão, os corantes são separados, devido a hidrólise da sonda pela atividade exonucleásica 5'→3' da Taq DNA polimerase, permitindo a emissão de fluorescência do *reporter* (RASMUSSEN, 2006).

Nestes três sistemas, o aumento da quantidade de fluorescência medida é proporcional ao aumento da quantidade de DNA gerado durante a PCR. A

amplificação do DNA alvo e a detecção dos produtos da PCR em tempo real são realizadas em um termociclador acoplado a um módulo ótico e programa para aquisição de dados e análise dos resultados (RASMUSSEN, 2006).

No Brasil, foram realizados dois estudos em que foi empregada PCR em tempo real para detecção de *L. monocytogenes* em alimentos, sendo que em apenas um deles foram utilizadas amostras de hortaliças folhosas minimamente processadas, não fornecendo dados quantitativos (FRÖDER et al., 2007; HOROTA et al., 2005).

Algumas características das técnicas da PCR convencional e PCR em tempo real estão mostradas comparativamente na Tabela 2.

Tabela 2 – Comparação entre a PCR convencional e a PCR em tempo real aplicadas à detecção e quantificação de bactérias patogênicas em alimentos.

Características	PCR convencional	PCR em tempo real
Equipamentos	Termociclador Sistema de eletroforese Sistema de fotodocumentação	Termociclador com sistema ótico integrado para detecção
Alvo	DNA ou RNA	DNA ou RNA
Detecção	Ponto final da reação	Fase exponencial da reação
Especificidade	Menor	Maior
Sistema	Não-automatizado	Automatizado
Interpretação dos resultados	Baseado na observação de bandas em gel de agarose	Baseado em valores de CT*, determinados por um <i>software</i>
Tempo de execução	18–48 horas (enriquecimento) 6 a 8 horas (ensaio)	18–48 horas (enriquecimento) 2 a 3 horas (ensaio)
Geração de resíduos tóxicos	Sim	Não
Custo	Menor	Maior (alto custo do equipamento)
Possibilidade de contaminação pós - amplificação	Sim	Não

Fonte: modificado de Swaminathan (2007a)

*CT: *Cycle Threshold*

1.6. *Salmonella* sp.

Salmonella sp. são bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. O gênero *Salmonella* consiste de microrganismos com ampla capacidade de adaptação a condições ambientais extremas, sendo um dos patógenos veiculados por alimentos da maior importância, por causar grandes surtos, muitos dos quais com caráter epidêmico (ANDREWS et al., 2001; D'AOUST, 2007).

De acordo com a classificação atual, o gênero *Salmonella* compreende duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*, contendo aproximadamente 2500 sorotipos. A maioria das cepas isoladas do homem e de animais domésticos pertence a *S. enterica* subespécie *enterica* (POPOFF, 2001).

Salmonelas podem causar diversas doenças em humanos, incluindo febre tifóide, febres entéricas e enterocolites. Além disso, podem induzir o aparecimento de doenças crônicas, como por exemplo, artrite reativa (D'AOUST, 2007).

Salmonella sp. pode contaminar e multiplicar-se em diferentes alimentos e os principais surtos relatados envolveram ovos e produtos à base de ovos, carnes de frango e peru mal cozidas, bem como frutas e hortaliças (D'AOUST, 2007; SAGOO et al., 2003b).

Nas duas últimas décadas, as frutas e hortaliças têm sido consideradas responsáveis pela ocorrência de vários surtos de salmonelose. Segundo D'Aoust, (2007), as principais causas podem estar ligadas ao uso de fertilizantes orgânicos não compostados ou parcialmente compostados, irrigação com águas superficiais contaminadas e exposição do produto a animais silvestres infectados.

Devido à sua importância como patógeno veiculado por alimentos, a legislação brasileira (BRASIL, 2001) preconiza a pesquisa de *Salmonella* sp. em

hortaliças frescas, *in natura*, preparadas, sanificadas, refrigeradas ou congeladas, determinando sua ausência em 25 g da amostra.

1.7. Microrganismos indicadores de contaminação

Microrganismos indicadores são grupos ou espécies de microrganismos que indicam as condições higiênico-sanitárias de alimentos através da possível contaminação fecal, provável presença de patógenos, deterioração potencial do produto e condições de higiene durante processamento, produção, armazenamento, transporte, entre outros (LANDGRAF, 1996).

Em hortalças frescas, *in natura*, preparadas, sanificadas, refrigeradas ou congeladas, a legislação brasileira (BRASIL, 2001) preconiza a quantificação de coliformes termotolerantes, aceitando no máximo uma população de $1,0 \times 10^2$ NMP/g.

Populações de microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos, em produtos refrigerados têm sido usadas como indicadores de qualidade higiênica dos alimentos, fornecendo também idéia sobre seu tempo útil de conservação. Populações elevadas destes microrganismos contribuem para a redução da vida de prateleira de hortalças minimamente processadas, podendo indicar matéria-prima excessivamente contaminada, limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas, higiene insuficiente na produção e condições inadequadas de tempo/temperatura durante a produção ou conservação dos alimentos (BRUNO et al., 2005).

As indústrias de alimentos têm grande preocupação em fornecer produtos microbiologicamente seguros e que atendam à grande demanda de alimentos prontos para o consumo e minimamente processados. Neste contexto, dados sobre as condições higiênico-sanitárias desta nova classe de alimentos, são de grande relevância, havendo destacado interesse na quantificação de *L. monocytogenes*, por ser um microrganismo responsável por alto índice de letalidade e, quantificação de *Salmonella* sp., devido à habilidade deste patógeno em causar grandes surtos de toxinfecções alimentares.

2. OBJETIVOS

1. Detectar *Listeria* sp. em hortaliças minimamente processadas, através do imunoensaio *Listeria Rapid Test* Oxoid.
2. Quantificar *L. monocytogenes* por Número Mais Provável (NMP) nas amostras de hortaliças minimamente processadas positivas para *Listeria* sp., por método convencional de cultivo.
3. Quantificar *L. monocytogenes* por Número Mais Provável (NMP) nas amostras de hortaliças minimamente processadas positivas para *Listeria* sp., empregando PCR em tempo real e avaliar a viabilidade da utilização deste ensaio em comparação ao método convencional.
4. Determinar Presença ou Ausência de *Salmonella* sp. em hortaliças minimamente processadas, através do método convencional.
5. Determinar o Número Mais Provável (NMP) de *Salmonella* sp. nas amostras de hortaliças minimamente processadas positivas pelo método convencional de Presença ou Ausência.
6. Complementar a avaliação da qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas por meio de enumeração de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e bactérias aeróbias psicrotróficas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Amostras de alimentos e amostragem

No período de setembro de 2007 a agosto de 2008 foram adquiridas 162 amostras de hortaliças minimamente processadas, em seis redes de supermercados da cidade de Ribeirão Preto, SP. A frequência de análises foi de quatro amostras por semana. Amostras de aproximadamente 300g foram obtidas conforme disponibilidade no estabelecimento comercial sorteado para a aquisição no dia da análise e eram compostas de um único tipo de hortaliça, acelga, agrião, alface, almeirão, cheiro-verde, chicória, couve, repolho, espinafre e rúcula. Todas as amostras foram adquiridas em suas embalagens originais, intactas e dentro do prazo de validade de até oito dias (conforme declarado pelos fabricantes). Foram transportadas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável, até o laboratório, onde foram conservadas sob refrigeração (2°C a 8°C), por no máximo 4 horas, até o momento da análise.

3.1.2. Coleta das amostras de hortaliças minimamente processadas

A parte externa das embalagens das hortaliças foi sanitizada com álcool 70% (v/v), aberta com facas esterilizadas e o conteúdo foi transferido para bandejas de aço inoxidável esterilizadas. Cada amostra foi homogeneizada, com o auxílio de talheres esterilizados e dividida em três porções: a primeira porção foi utilizada para análise imediata, a segunda porção foi mantida sob refrigeração e a terceira porção foi congelada em bolsas de polietileno esterilizadas (NASCO, EUA). A segunda e terceira porções foram reservadas para a realização de análises quantitativas de *Listeria monocytogenes* e/ou *Salmonella* sp.

3.1.3. Cepas bacterianas

Na Tabela 3 estão listadas as cepas bacterianas que foram utilizadas neste estudo. Estas cepas foram obtidas da coleção de culturas do Instituto Adolfo Lutz (IAL) – Laboratório Central – SP, do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional de Ribeirão Preto, do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) - USP e do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ). Todas as cepas foram mantidas a – 70°C em Caldo Trypticase Soja adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSBYE) (Oxoid) ou em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) (Oxoid), ambos acrescidos de 20% de glicerol.

Tabela 3 – Cepas de *Listeria* utilizadas neste estudo em análises de Presença/Ausência e quantificação de *Listeria* sp.

Espécies	Cepas*	Outras descrições
<i>Listeria monocytogenes</i> , sorotipo 4b	ATCC 19115	IAL 632
<i>Listeria monocytogenes</i> , sorotipo 4a	ATCC 19114	IAL 631
<i>Listeria monocytogenes</i> , sorotipo 1/2a	IAL 633	
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19122	
<i>Listeria monocytogenes</i>	IALRP 167 me	
<i>Listeria monocytogenes</i>	IALRP 27 me	
<i>Listeria monocytogenes</i>	IALRP 26 me	
<i>Listeria monocytogenes</i>	IALRP H 21	
<i>Listeria monocytogenes</i>	IALRP H 23	
<i>Listeria ivanovii</i>	IAL 1983	
<i>Listeria welshimeri</i>	CIP 8149	IAL 1819
<i>Listeria welshimeri</i>	FCFRP LwVa1	
<i>Listeria innocua</i>	IAL 1984	
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090	INCQS 500354
<i>Listeria innocua</i>	IALRP H 133	
<i>Listeria innocua</i>	IALRP H 140	
<i>Listeria innocua</i>	IALRP H 158	
<i>Listeria seeligeri</i>	CIP 100100	IAL 1820
<i>Listeria seeligeri</i>	FCFRP LsVa 1	
<i>Listeria grayi</i>	FCFRP LgVa1	

*ATCC, American Typing Culture Collection, EUA; IAL, Instituto Adolfo Lutz, SP; IALRP, Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto; CIP, Collection Institut Pasteur; INCQS, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; FCFRP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Tabela 4 – Cepas bacterianas utilizadas como controles nas técnicas convencionais realizadas para avaliação da qualidade microbiológica de amostras de hortaliças minimamente processadas e em testes de exclusividade para a técnica de PCR em tempo real.

Espécies	Cepas*	Outras descrições
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	IAL 2432
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC29212	
<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC 6939	
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 14028	INCQS 150
<i>Shigella sonnei</i>	CIP 6310	IAL 1585
<i>Proteus mirabilis</i>	CDC 305	IAL 022
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	IAL 339
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	IAL 1026
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031	IAL 520
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CDC 1535	IAL 106
<i>Citrobacter diversus</i>	IAL 1816	

*ATCC, American Typing Culture Collection, EUA; CIP, Collection Institut Pasteur; IAL, Instituto Adolfo Lutz, SP; CDC, Centers for Disease Control and Prevention; INCQS, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

3.2. Métodos

3.2.1. Culturas puras e contaminação artificial de amostras de hortaliças

As cepas de *Listeria* sp. (Tabela 3) foram cultivadas em 10 mL de TSBYE e incubadas a 30°C por 24 horas, enquanto que as outras cepas (Tabela 4) foram cultivadas em 10 mL de caldo BHI e incubadas a 35°C por 24 horas.

3.2.2. Pesquisa de *Listeria* sp. por imunoensaio

A pesquisa de *Listeria* sp. (Presença ou Ausência) foi realizada empregando-se o *Listeria Rapid Test* Oxoid, conforme protocolo do fabricante (OXOID, 2007). O procedimento de enriquecimento e a realização do teste estão representados na Figura 5. Para controle de qualidade do procedimento laboratorial utilizado foram retiradas alíquotas do caldo BLEB (*Buffered Listeria Enrichment Broth* – BLEB) (Oxoid – CM 897), após o período de incubação (30°C por 24 horas) (Figura 5) para

semeadura por esgotamento em placas contendo Ágar Palcam (PAL) (Oxoid) e Ágar Oxford (OX) (Oxoid) que foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 - 48 horas. A verificação da pureza e a identificação dos isolados seguiram o descrito por Hitchins (2003). Foram consideradas positivas somente as amostras em que a presença de *Listeria* sp. foi confirmada através dos testes de cultivo descritos por Hitchins (2003).

Para cada novo lote do produto *Listeria Rapid Test* Oxoid foram realizados controles positivo e negativo, conforme instruções do fabricante. Para o controle positivo, 135 µL de uma suspensão de antígeno flagelar não viável de *L. monocytogenes*, incluído no kit, foi aplicada na janela do teste destinada à amostra (aparecimento de linha azul no centro da janela resultado do teste) e para o controle negativo foram utilizados 135 µL do BLEB sem inoculação (janela resultado do teste inalterada).

Figura 5. Representação esquemática da técnica empregada para detecção de *Listeria* sp. em amostras de hortaliças minimamente processadas (OXOID, 2007). ^{*}Fraser (Oxoid – CM0895) acrescido de 4 mL de *Half Fraser Supplement* (Oxoid SR 166M). ^{**}BLEB (*Buffered Listeria Enrichment Broth* Base, Oxoid - CM0897); ^{***}*Listeria Selective Enrichment Supplement* (Oxoid – SR0141E).

3.2.3. Quantificação de *L. monocytogenes* por método convencional

A quantificação de *L. monocytogenes* foi realizada por meio da técnica do Número Mais Provável (NMP) (SWANSON; PETRAN; HANLIN, 2001) pelo método convencional (HITCHINS, 2003).

Na Figura 6 está representado o método convencional utilizado para a quantificação das amostras de hortaliças minimamente processadas, previamente detectadas como positivas no imunensaio *Listeria Rapid Test Oxoid* (item 3.2.2)

Porções de 50g, das amostras congeladas e/ou refrigeradas de hortaliças minimamente processadas (item 3.1.2) foram homogeneizadas, em bolsas plásticas esterilizadas, com 450 mL de caldo de enriquecimento para *Listeria*. A partir deste homogeneizado, foram preparadas diluições decimais seriadas em 90 mL de Tampão Fosfato (TP - 0,01M, pH 7,2) que foram posteriormente semeadas em séries de 3 tubos contendo BLEB, de maneira que correspondiam a 10g, 1g, 0,1g, 0,01g, 0,001g, 0,0001g, 0,00001g e 0,000001g de amostra. Após incubação a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 4 horas, a cada tubo foram adicionados 40 μL de BLEB *Selective Enrichment Broth* e os tubos foram reincubados por mais 44 horas a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$. A partir destes tubos foram realizadas semeaduras por esgotamento em superfície de placas contendo ágar seletivos OX e PAL e incubados a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 - 48 horas.

O caldo de enriquecimento restante foi centrifugado, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi armazenado a -20°C para análise posterior por PCR em tempo real.

A partir de cada placa de OX e PAL foram selecionadas de três a cinco colônias com características visuais típicas de *Listeria* sp. No ágar OX, as colônias de *Listeria* sp. são côncavas, acinzentadas e rodeadas por halo negro, enquanto que

no ágar PAL são colônias cinza esverdeadas, com centro côncavo e halo negro devido à hidrólise da esculina. As colônias selecionadas foram purificadas por semeadura em superfície de placas contendo ágar tripticase de soja adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSAYE). Após incubação a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 - 48 horas. De acordo com a técnica descrita por Moura et al. (1991) as placas foram examinadas sob transiluminação e as colônias características (azuladas) submetidas à identificação bioquímica.

Culturas puras obtidas em TSAYE foram transferidas para TSBYE, com posterior incubação a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Estes caldos foram utilizados na realização de testes bioquímicos de fermentação de carboidratos.

A caracterização de *L. monocytogenes* foi realizada através das seguintes provas: coloração de Gram; motilidade; produção de catalase; fermentação de dextrose, manitol, maltose, ramnose e xilose; hemólise; redução de nitrato; Vermelho de Metila/Voges Proskauer e teste de CAMP (HITCHINS, 2003).

As cepas de diferentes espécies de *Listeria*, *S.aureus* e *R. equi* apresentadas nas Tabelas 3 e 4 foram utilizadas como controles das reações de caracterização bioquímica da espécie e realização de teste de CAMP.

Após identificação, o NMP de *L. monocytogenes* por grama do alimento foi calculado utilizando-se tabela de conversão para três tubos (intervalo de confiança de 95%) (SWANSON; PETRAN; HANLIN, 2001).

3.2.4. Quantificação de *L. monocytogenes* por PCR em tempo real

3.2.4.1. Inoculação das amostras de hortaliças minimamente processadas

Para comparar o método da PCR em tempo real com o método convencional de cultivo na avaliação quantitativa de *L. monocytogenes* em hortaliças cruas, foram analisadas todas as amostras naturalmente contaminadas obtidas neste estudo e amostras artificialmente contaminadas. Para isso, os trabalhos de Feldsine, Abeyta e Andrews (2002a) e Freitas, Lemos e Marin (2006) foram utilizados como referência. Segundo Feldsine, Abeyta e Andrews (2002a), amostras artificialmente contaminadas para validação de método quantitativo podem ser utilizadas se o método é para um microrganismo específico que não é encontrado rotineiramente em todos os tipos de alimentos, como por exemplo, enumeração de *Listeria* sp.

De Martinis, Duvall e Hitchins (2007) propuseram um ensaio de PCR em tempo real com especificidade para quantificação de *L. monocytogenes* aplicável em alimentos, incluindo alface. Naquele trabalho foram avaliadas somente amostras artificialmente contaminadas. Deste modo, no presente estudo foi avaliado o desempenho do método de De Martinis, Duvall e Hitchins (2007) para seis tipos de hortaliças: alface, acelga, repolho, couve, almeirão e cheiro-verde. Foi analisado um controle não inoculado para cada tipo de hortaliça e três níveis de inoculação de *L. monocytogenes* ATCC 19114.

3.2.4.2. Preparação do DNA

Foi utilizado o método de ebulição para extração de DNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992) modificado por Hitchins et al. (2004), pela omissão de Triton X-100. Os caldos de enriquecimento semeados em 3.2.3 foram utilizados para realizar a extração de DNA. Estes caldos foram centrifugados por 15 minutos a 10°C e 8.000g (Sorvall, centrífuga refrigerada de alta velocidade, Thermo Electron

Corporation, Alemanha). Os sobrenadantes das culturas foram descartados. Os sedimentos foram ressuspensos em 5 mL de salina fosfatada tamponada, pH 7,0 (PBS – do inglês *Phosphate Buffered saline*), constituída de solução de cloreto de sódio (0,8%) (Synth, Brasil), cloreto de potássio (0,020%) (Merck, Alemanha), fosfato de sódio dibásico (0,115%) (Vetec, Brasil) e fosfato de potássio monobásico (0,020%) (Synth, Brasil) e re-centrifugados por 10 minutos a 10°C e 8.000 g. Os sobrenadantes foram novamente descartados e os sedimentos foram ressuspensos em 2 mL de água (água destilada, deionizada e purificada em sistema purificador Milli-Q, Millipore, EUA). As suspensões foram aquecidas a 100°C por 10 minutos em banho de água em ebulição e imediatamente resfriadas (banho de gelo). Após centrifugação por 10 minutos a 10°C e 8.000 g, os sobrenadantes foram retidos e os sedimentos foram descartados. O DNA extraído foi estocado à – 20°C para análise posterior.

Uma cultura pura de *L. monocytogenes* ATCC 19114 foi utilizada como controle positivo. O método utilizado para extração do DNA de culturas puras foi o mesmo utilizado para a extração do DNA dos caldos de enriquecimento das amostras de hortaliças, conforme descrito no parágrafo anterior. O DNA extraído de *L. monocytogenes* ATCC 19114 foi quantificado por espectrofotometria na faixa de ultravioleta (UV) (260nm) (SHIMADZU UV-mini 1240, Kyoto, Japão). A quantificação do extrato foi feita considerando que uma solução de DNA de fita dupla com concentração de 50 ng/μL apresenta densidade ótica 1,0 a 260nm (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

3.2.4.3. Otimização do ensaio de PCR em tempo real

Para a detecção de *L. monocytogenes* nos extratos de DNA obtidos foram utilizados os *primers* L-1 (5'-CACGTGCTACAATGGATAG-3') e L-2 (3'-

GATTAGGGTATTTTGATAAGA-5') previamente descritos por Wang, Cao e Johson (1992). Os *primers* foram obtidos da empresa Invitrogen, EUA e as reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 μ L, contendo 12,5 μ L de ABSOLUTE™ QPCR SYBR® Green Mix (ABgene, Reino Unido), 4 μ L de extrato de DNA (ou diluição apropriada) e 1,25 μ L de solução de *primer* 16S rRNA (0,25 μ M de cada *primer*, L-1 e L-2). A amplificação do DNA alvo e a detecção dos produtos da PCR em tempo real foram feitas no equipamento "MiniOpticon™ System" (Bio-Rad Laboratories, EUA) com programa para aquisição de dados e análise dos resultados (MJ Opticon Monitor Analysis Software – version 3.1, Bio-Rad Laboratories, EUA).

O corante intercalante SYBR® Green permitiu a monitoração contínua da fluorescência. O amplicom obtido foi caracterizado pela curva de fusão (*Melting curve*).

A programação térmica utilizada para amplificação foi: 15 minutos a 95°C, 45 ciclos com 2 segundos a 95°C (desnaturação), 10 segundos a 55°C (anelamento) e 10 segundos a 72°C (extensão). Após a amplificação os produtos de PCR foram submetidos à curva de dissociação a temperatura crescente (0,3°C/s) de 60 até 95°C, para se obter a temperatura de fusão do amplicon (DE MARTINIS; DUVALL; HITCHINS 2007).

Os produtos de amplificação da PCR em tempo real também foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3% em TAE 1X (Tris-base 0,04M, EDTA 0,001M, acetato de sódio 0,04M, pH 8,5) e com 0,5 μ g/mL de brometo de etídio (Vetec, Brasil). Foram aplicados no gel 5 μ L da mistura da reação após amplificação acrescido de 3 μ L do tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,25% (Vetec, Brasil) e glicerol 30% (Synth, Brasil)). O desenvolvimento eletroforético foi realizado a 110 V, 1,81 A (FB 200, Fisher Scientific, EUA) por um

período de 1h e 15 minutos. A seguir, o gel foi observado em transiluminador com luz ultravioleta e documentado por meio de sistema de captação de imagens (MiniBio UV, DNR Bio-Imaging Systems, Israel). O peso molecular dos produtos da PCR (70pb) foi determinado pela comparação com o marcador de peso molecular de 50pb (Invitrogen, Carlsbad, EUA) que também foi submetido à eletroforese junto com a amostra no mesmo gel.

A análise dos produtos de amplificação da PCR em tempo real por eletroforese em gel de agarose foi realizada para confirmar a especificidade da amplificação do DNA de *L. monocytogenes*.

3.2.4.4. Análise Estatística

Para a comparação dos resultados obtidos entre os dois métodos de quantificação (método convencional de cultivo e PCR em tempo real) foi utilizado o *software* SigmaStat 3.2 (Jandel Scientific, Alemanha). Foi avaliada a equivalência entre os dois métodos por meio de análise de variância de um fator (ANOVA), com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.2.5. Avaliação da qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas

3.2.5.1. Pesquisa de *Salmonella* sp.

Pesquisa de *Salmonella* sp. foi realizada conforme método descrito por Andrews e Hammack (2003) e os resultados foram apresentados como Presença ou Ausência.

Para isso, vinte e cinco gramas de cada amostra de hortaliça foram homogeneizados com 225 mL de Água Peptonada 1% Tamponada (APT) (Merck CM 0509, Alemanha), em bolsas plásticas esterilizadas, homogeneizadas e

deixadas em repouso durante 60 minutos à temperatura ambiente, quando então o pH foi verificado, com papel indicador e se necessário, ajustado com hidróxido de sódio (NaOH) 1N, para $6,8 \pm 0,2$. O homogeneizado foi incubado a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 - 24 horas. Após esta etapa foi realizado o enriquecimento seletivo, com a transferência de 1 mL e 0,1 mL da APT para 10 mL de Caldo Tetrationato (TT) (Merck) e 10 mL de Caldo Rappaport Vassiliadis (RV) (Merck), respectivamente, com incubação a $42 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 - 24 horas, ambos em banho-maria com agitação.

O isolamento de *Salmonella* sp. a partir dos caldos de enriquecimento foi realizado por semeadura por esgotamento de 10 μL de cada caldo (TT e RV) em superfície de placas contendo Ágar Hektoen Enteric (HE) (Merck) e Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) (Merck). A incubação foi realizada a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 - 24 horas.

Foram selecionadas três colônias de cada placa de meio seletivo e diferencial (HE e XLD), com características visuais de *Salmonella* sp. (colônias negras ou verde-azuladas com centro negro no HE e colônias negras ou transparentes, com centro negro no XLD). Os isolados foram semeados em tubos contendo Ágar Nutriente (Merck) e incubados $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 - 24 horas. Após o período de incubação foi realizada coloração de Gram e as colônias purificadas foram semeadas em Ágar Ferro Tríplice Açúcar (TSI) (Merck), Ágar Lisina Ferro (LIA) (Merck) e em Caldo Uréia (Merck). Todos o tubos semeados foram incubados a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 - 24 horas.

Testes de utilização de indol e reações de aglutinação com anti-soros somático (O) e flagelar (H) também foram utilizados para confirmação de *Salmonella* sp.

O controle positivo da triagem bioquímica e as reações sorológicas foram realizados com a cepa *S.Typhimurium* (Tabela 4). Como controle negativo da reação da urease foi utilizada a cepa *Proteus mirabilis* (Tabela 4).

Os isolados de *Salmonella* sp. obtidos foram sorotipados no Setor de Enterobactérias da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central - SP, de acordo com Popoff et al. (2001).

3.2.5.2. Quantificação de *Salmonella* sp.

As amostras positivas para *Salmonella* sp. foram selecionadas para análise quantitativa pela técnica do Número Mais Provável (NMP) (SWANSON; PETRAN; HANLIN, 2001) conforme método descrito por Andrews e Hammack (2003).

Para isso, porções de 50g das amostras de hortaliças minimamente processadas, congeladas (item 3.1.2) foram homogeneizadas, em bolsas plásticas esterilizadas, com 450 mL de Água Peptonada 1% Tamponada (APT) (CM 0509 – Merck). Este homogeneizado foi utilizado para preparar diluições decimais seriadas em 90 mL de Tampão Fosfato (TP - 0,01M, pH 7,2) e posterior semeadura em séries de 3 tubos contendo APT, de maneira que correspondiam a 10g, 1g, 0,1g, 0,01g, 0,001g, 0,0001g, 0,00001g e 0,000001g de amostra. A seqüência da análise foi realizada com todos os caldos que apresentaram turvação, após incubação a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 - 24 horas, de acordo com o descrito no item 3.2.5.1.

Após confirmação bioquímica e sorológica dos isolados obtidos, o NMP/g de *Salmonella* sp. foi calculado utilizando-se tabela de conversão para três tubos (intervalo de confiança de 95%) (SWANSON; PETRAN; HANLIN, 2001).

3.2.5.3. Enumeração de microrganismos indicadores

As análises de coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli* foram realizadas por métodos convencionais, segundo Swanson, Petran e Hanlin (2001) e Kornacki e Johnson (2001).

O NMP de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E.coli* por grama de alimento foi calculado utilizando-se tabela de conversão para 3 tubos (NMP/g e intervalo de confiança de 95%) (SWANSON; PETRAN; HANLIN, 2001).

As populações de bactérias aeróbias psicrotróficas foram enumeradas por método convencional, segundo Swanson, Petran e Hanlin (2001). Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por grama de alimento (UFC/g).

3.2.5.4. Comparação dos resultados obtidos nos ensaios realizados para a avaliação da qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas

Os resultados obtidos nos ensaios de avaliação da qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas foram comparados com os padrões estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2001) e com dados de pesquisas realizadas no Brasil (BRUNO et al., 2005; FRÖDER et al., 2007; PAULA et al., 2003) e em outros países (ABADIAS et al., 2008; PINGULKAR; KAMAT; BORGIRWAR, 2001; SAGOO et al., 2003b).

Para a comparação dos resultados obtidos na enumeração de bactérias aeróbias psicrotróficas também foi utilizado o método de análise de variância de um fator (ANOVA). No caso da rejeição nos testes de normalidade ou de igualdade de variâncias das populações (premissas para a utilização do método ANOVA) foi utilizado o teste de hipótese não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para a realização destes testes foi utilizado o *software* SigmaStat 3.2 (Jandel Scientific, Erkrath Germany).

4. *RESULTADOS*

4.1. Avaliação da qualidade microbiológica das hortaliças minimamente processadas analisadas

De setembro de 2007 a agosto de 2008 foram analisadas 162 amostras de hortaliças minimamente processadas, adquiridas em seis redes de supermercados da cidade de Ribeirão Preto – SP.

Na Tabela 8 (Apêndice A) observa-se que entre os 10 diferentes tipos de hortaliças avaliados, a população de coliformes totais estava abaixo do limite de quantificação do método ($< 0,3$ NMP/g) em apenas quatro amostras de alface. A maioria das hortaliças analisadas (81,5%) apresentou população de coliformes totais acima de $1,0 \times 10^3$ NMP/g, sendo que, todas as amostras de almeirão, cheiro-verde e rúcula apresentaram populações acima de $1,0 \times 10^3$ NMP/g.

Conforme dados demonstrados na Tabela 5, coliformes termotolerantes foram detectados em 107 (66%) das amostras analisadas. Dentre estas amostras, 74 (69,2%) apresentaram populações acima de $1,0 \times 10^2$ NMP/g que é o máximo tolerado pela legislação brasileira para este tipo de alimento (BRASIL, 2001).

A presença de *E. coli* foi confirmada em 86 (53,1%) amostras. As hortaliças que apresentaram maior número de amostras positivas (21 cada) para *E. coli* foram o cheiro-verde e a couve, seguido de repolho (14 amostras), chicória (7 amostras) e espinafre e almeirão (6 amostras cada). As amostras de alface, que em sua maioria eram apenas desfolhadas e não picadas apresentaram menor porcentagem de contaminação em relação às outras hortaliças (Tabela 5).

As populações de bactérias aeróbias psicrotróficas encontradas na maioria das amostras analisadas neste estudo foram elevadas, sendo maior que 5 log UFC/g (limite de detecção na técnica de contagem padrão em placas utilizada neste estudo) em 96,3% do total de amostras analisadas (Tabela 8, Apêndice A).

Tabela 5 - Ocorrência de microrganismos indicadores de contaminação (coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*) em amostras de hortaliças minimamente processadas.

Hortaliças	N	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes	<i>Escherichia coli</i>
		n (%)	n (%)	n (%)
Acelga	13	13 (100,0)	7 (53,8)	2 (15,4)
Agrião	4	4 (100,0)	2 (50,0)	1 (25,0)
Alface	26	22 (78,6)	8 (30,8)	5 (19,2)
Almeirão	13	13 (100,0)	11 (84,6)	6 (46,2)
Cheiro-verde	22	22 (100,0)	22 (100,0)	21 (95,6)
Chicória	11	11 (100,0)	8 (72,7)	7 (63,3)
Couve	30	30 (100,0)	25 (83,3)	21 (70,0)
Espinafre	9	9 (100,0)	6 (66,7)	6 (66,7)
Repolho	28	28 (100,0)	14 (50,0)	14 (50,0)
Rúcula	6	6 (100,0)	4 (66,7)	3 (50,0)
Total	162	158 (97,5)	107 (66,0)	86 (53,1)

N = número de amostras analisadas; n = número de amostras positivas

Na Figura 7 observa-se que entre os diferentes tipos de hortaliças, a média da população de bactérias aeróbias psicrotróficas variou de 6,8 a 9,5 log UFC/g, sendo que, as maiores populações foram encontradas nas amostras de cheiro-verde (média de 9,5 log UFC/g), seguido das amostras de rúcula (média de 9,3 log UFC/g) e almeirão (média de 8,6 log UFC/g).

Figura 7. Populações de bactérias aeróbias psicrotróficas em hortaliças minimamente processadas. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos e os respectivos desvios padrão.

Na Figura 8 é verificado que a maioria das amostras (35) foi analisada no 2º dia de prateleira, seguida pelas amostras que estavam no 3º ou 5º dia de validade (33 cada).

Para a comparação dos resultados obtidos na enumeração de bactérias aeróbias psicrotróficas foi utilizado o método de análise de variância de um fator (ANOVA), seguido do teste de Kruskal-Wallis, considerando o nível de significância 5% ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 1,000$) entre as médias das populações de bactérias aeróbias psicrotróficas das hortaliças analisadas em relação ao diferente tempo de prateleira (Figura 8).

Figura 8. Número de amostras avaliadas e médias das populações de bactérias aeróbias psicrotróficas (log UFC/g) encontradas nas hortaliças minimamente processadas analisadas em relação ao tempo de prateleira (dias) no momento da análise.

Dentre as 162 hortaliças minimamente processadas avaliadas foi isolada *Salmonella* sp. de 2 amostras (1,2%). Os resultados positivos foram obtidos para as amostras de almeirão (n.^{os} 45 e 95, Tabela 8, Apêndice A), com positividade de 15,4% do total das amostras analisadas desta hortaliça (n=13).

Estas duas amostras também apresentaram populações de coliformes termotolerantes de $4,3 \times 10^3$ e $1,1 \times 10^6$, amostra 45 e 95, respectivamente, acima de $1,0 \times 10^2$ NMP/g que é o máximo tolerado pela Resolução RDC Nº 12 da ANVISA (BRASIL, 2001) e populações de bactérias aeróbias psicrotróficas de 8,5 e 8,3 log UFC/g para a amostra 45 e 95, respectivamente (Tabela 8, Apêndice A).

Na quantificação das amostras previamente detectadas como positivas para *Salmonella* sp. foram encontrados 0,09 e 4,6 NMP por grama de hortaliça (amostras n.^{os} 45 e 95, respectivamente).

O isolado da amostra 45 foi determinado como o sorotipo *S. Madelia* e da amostra 95 como sorotipo *S. London*.

Todos os resultados das análises microbiológicas, quanto à qualidade das 162 amostras de hortaliças minimamente processadas avaliadas podem ser observados nas Tabelas 5 e 8 (Apêndice A).

4.2. Detecção de *Listeria* sp. por imunoensaio (*Listeria Rapid Test Oxoid*)

Neste estudo, *Listeria* sp. foi detectada em 6 (3,7%) das 162 amostras avaliadas. *L. monocytogenes* foi detectada em 2 (1,2%) e *L. innocua* em 4 (2,4%) amostras. Considerando os diferentes tipos de hortaliças, *L. monocytogenes* estava presente em 1 (3,3%) das 30 amostras de couve picada e, em 1 (4,5%) das 22 amostras de cheiro-verde avaliadas. *L. innocua* foi isolada em 1 (11,1%) amostra de espinafre, 1 (4,5%) amostra de cheiro-verde, 1 (7,7%) amostra de acelga e 1 (3,3%) amostra de couve (Figura 9).

Todas as amostras avaliadas pelo imunoensaio foram confirmadas pelo método convencional de detecção. Não houve diferença entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Uma das vantagens da utilização de métodos rápidos de detecção de microrganismos em alimentos é a facilidade de serem analisadas várias amostras em um mesmo dia e em um curto período de tempo

As amostras de couve e cheiro-verde contaminadas por *L. monocytogenes* também apresentaram populações elevadas de bactérias aeróbias psicrotróficas (> 6 log UFC/g), de coliformes termotolerantes ($> 1,0 \times 10^6$ NMP/g) e de *E. coli* (Tabela 8, Apêndice A).

Figura 9. Porcentagem de amostras positivas para *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* por tipo de hortaliça minimamente processada analisada.

4.3. Quantificação de *L. monocytogenes* por PCR em tempo real em hortaliças minimamente processadas

O método de PCR em tempo real empregado permitiu a obtenção de um *amplicon* com *primers* para 16S rRNA, com T_m variando de 79 a 79,40 (Figura 13), próximos ao valor hipotético de 80, 55°C calculado por De Martinis, Duvall e Hitchins (2007).

Para estimativa do limite de detecção do método de PCR em tempo real, foram utilizados extratos de DNA obtidos de culturas puras. O número de cópias de DNA em 4µL de extrato (volume utilizado por PCR em tempo real), determinado por espectrofotometria, foi de $1,3 \times 10^8$. Para este cálculo foi considerado que havia 1 cópia de DNA por célula e que cerca de 6×10^{23} moléculas de DNA de *L. monocytogenes* correspondiam a 2×10^9 g (DE MARTINIS; DUVAL; HITCHINS, 2007).

Como demonstrado na Figura 10 houve amplificação de até 10^3 cópias de DNA de *L. monocytogenes* por reação e a T_m obtida com a curva de dissociação foi de 79,4°C para 10^5 cópias de DNA e 79 para 10^4 e 10^3 cópias de DNA

Na Figura 11 pode ser observada a linearidade do método, com a amplificação dos extratos contendo de 10^5 a 10^3 cópias de DNA, com um coeficiente de regressão linear de $R^2 = 1$.

O *amplicon* da reação foi analisado através de eletroforese em gel de agarose (Figura 12) e os dados obtidos demonstraram ausência de bandas inespecíficas e confirmaram o tamanho do fragmento de amplificado (70pb).

Figura 10. Resultados da PCR em tempo real para estimativa do limite de detecção do método com *primer* 16S rRNA para pesquisa de *Listeria monocytogenes* (WANG; CAO; JOHNSON, 1992): I. Curva de amplificação, II. Curva de dissociação, ■ 10^5 cópias de DNA, ■ 10^4 cópias de DNA, ■ 10^3 cópias de DNA, ■ Branco, ■ *L. innocua*.

$$Y = -0,1773 + 5,94$$

$$R^2 = 1$$

10^5 cópias de DNA – CT = 22,74
 10^4 cópias de DNA – CT = 28,46
 10^3 cópias de DNA – CT = 34,02

Figura 11. Curva padrão demonstrando a linearidade da PCR em tempo real. Diluições seriadas de extratos de DNA de *L. monocytogenes* (10^5 a 10^3 cópias de DNA).

Figura 12. Gel de eletroforese dos *amplicons* das diluições seriadas dos extratos de DNA de *L. monocytogenes* obtidos por PCR em tempo real com *primer* 16S rRNA. Canaletas: 1. marcador de 50pb, 2. Branco e na sequência diluições dos extratos de 10^5 a 10^3 cópias de DNA.

Para avaliar a especificidade do método empregado, foram testadas 20 cepas: 9 *L. monocytogenes*, 5 *L. innocua*, 2 *L. welshimeri*, 2 *L. seeligeri*, 1 *L. ivanovii* e 1 *L. grayi* (Tabela 3). Todas as cepas de *L. monocytogenes* foram detectadas nos ensaios de PCR em tempo real, com valores de CT variando de 19,8 a 30 e T_m variando de 79 a 79,40. Para todas as outras cepas testadas não houve amplificação (Figura 13).

Figura 13. Resultados da PCR em tempo real com *primer* 16S rRNA quanto à especificidade de *Listeria monocytogenes* (WANG; CAO; JOHNSON, 1992) em relação a outras espécies de *Listeria*. I. Curva de amplificação II. Curva de dissociação.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para confirmação da especificidade através da análise do tamanho do fragmento de amplificação comparado com marcador de 50 pb (Figura 14).

Figura 14. Gel de eletroforese dos *amplicons* dos extratos de DNA de diferentes espécies de *Listeria* e *L. monocytogenes* obtidos por PCR em tempo real com *primer* 16S rRNA. Canaletas: 1. marcador de 50pb, 2. Branco, de 3 a 11 DNA de *L. monocytogenes* e de 12 a 22 DNA de outras espécies de *Listeria*.

A especificidade do ensaio de PCR em tempo real para *L. monocytogenes* também foi verificada frente a outras cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Foram testadas 14 cepas: (Tabelas 3 e 4). Somente *L. monocytogenes* foi detectada nos ensaios de PCR em tempo real. Para todas as outras cepas o pico de fluorescência ficou abaixo do ponto de detecção (Figura 15). A cepa de *S. aureus* apresentou um perfil irregular, pouco acima do *threshold*, mas a T_m obtida (94°C) foi muito diferente da T_m (79 - 79,4°C) específica para *L. monocytogenes*. Esses resultados demonstraram a boa especificidade do método de PCR em tempo real proposto.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e avaliados quanto a sua especificidade através da análise do tamanho do fragmento de amplificação comparado com o marcador de 50 pb (Figura 16).

Figura 15. Resultados da PCR em tempo real com *primer* 16S rRNA quanto à especificidade de *Listeria monocytogenes* (WANG; CAO; JOHNSON, 1992) em relação a diferentes cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas: I. Curva de amplificação. II. Curva de dissociação.

Figura 16. Gel de eletroforese dos *amplicons* dos extratos de DNA de *L. monocytogenes* e outras bactérias Gram positivas e Gram negativas obtidos por PCR em tempo real com *primer* 16S rRNA. Canaletas: 1. marcador de 50pb, 2. DNA de *L. monocytogenes*, 3. Branco e de DNA das bactérias avaliadas no teste de especificidade. I. (4 a 11): ■ *Escherichia coli*, ■ *Citrobacter diversus*, ■ *Shigella sonnei*, ■ *Enterobacter aerogenes*, ■ *Staphylococcus aureus*, ■ *Salmonella* Typhimurium, ■ *Klebsiella pneumoniae*, ■ *Proteus mirabilis*. II. (12 a 16): ■ *Bacillus cereus*, ■ *Pseudomonas aeruginosa*, ■ *Enterococcus faecalis*, ■ *Staphylococcus epidermidis*, ■ *Bacillus subtilis*.

4.4. Quantificação das amostras naturalmente contaminadas por *L. monocytogenes* (método convencional de cultivo e PCR em tempo real)

No método convencional de cultivo foram encontradas populações de *L. monocytogenes* de $7,5 \times 10$ NMP/g e $\geq 2,4 \times 10^6$ NMP/g, nas amostras refrigeradas de couve e cheiro-verde, respectivamente. Uma segunda porção do alimento, congelada no dia da coleta (item 3.1.2), foi analisada para comparação dos resultados. Foram encontradas populações de *L. monocytogenes* de $1,5 \times 10^3$ NMP/g e 0,43 NMP/g, na couve e cheiro-verde, respectivamente.

Na quantificação por PCR em tempo real foram encontradas populações de *L. monocytogenes* de 4,6 NMP/g e $4,6 \times 10^5$ NMP/g, nas amostras refrigeradas de couve e no cheiro-verde, respectivamente. Nas amostras congeladas foram encontradas populações de *L. monocytogenes* de $1,1 \times 10^2$ NMP/g e 0,04 NMP/g, na couve e cheiro-verde, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultado da quantificação de *L. monocytogenes* pela técnica do NMP (método convencional e PCR em tempo real) em amostras de hortaliças minimamente processadas naturalmente contaminadas.

Hortaliça		NMP por g do alimento (intervalo de confiança de 95%) ¹	
		Método convencional	Método da PCR em tempo real ²
Couve (H 21)	Refrigerada	$7,5 \times 10$ ($1,4 \times 10 - 2,3 \times 10^2$)	4,6 ($0,71 - 2,4 \times 10$)
	Congelada	$1,5 \times 10^3$ ($3 \times 10^2 - 4,4 \times 10^3$)	$1,1 \times 10^3$ ($1,5 \times 10^2 - 4,8 \times 10^3$)
Cheiro-verde (H 23)	Refrigerada	$\geq 2,4 \times 10^6$ ($\geq 1,5 \times 10^5 - \geq 4,8 \times 10^6$)	$4,6 \times 10^5$ ($7,1 \times 10^4 - 2,4 \times 10^6$)
	Congelada	0,43 ($< 0,05 - 2,0$)	0,04 ($< 0,005 - 0,20$)

¹Valores da tabela de NMP de Swanson, Petran e Hanlin (2001); ² PCR em tempo real desenvolvida com ABSOLUTE™ QPCR SYBR® Green Mix (ABgene, Reino Unido) e primer 16S rRNA (DE MARTINIS, DUVALL E HITCHINS 2007); H. legenda para hortaliça e respectivo número de identificação das amostras analisadas.

Nas Figuras 17 a 20 estão representados os ensaios da PCR em tempo real para as amostras de couve e cheiro-verde naturalmente contaminadas. Todos os ensaios foram realizados com um branco (água destilada, deionizada e purificada em sistema purificador Milli-Q, Millipore, EUA), um controle negativo (*L. innocua* ATCC 33090) e um controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 19114).

Devido à característica da matriz alimentícia (presença de pigmento verde), houve a formação de muitas curvas de amplificação de formato irregular e houve a necessidade de diluição dos extratos de DNA para evitar inibição da PCR por componentes do alimento. Nas Tabelas 9 a 12 (Apêndice B) estão mostrados os resultados, por tubo de reação, da quantificação de *L. monocytogenes* pelo método convencional e por PCR em tempo real das análises das hortaliças minimamente processadas naturalmente contaminadas, refrigeradas e congeladas.

Figura 17. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de couve (H.21) refrigerada, naturalmente contaminada por *Listeria monocytogenes*: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 18. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de couve (H.21c) congelada, naturalmente contaminada por *Listeria monocytogenes*: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 19. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de cheiro-verde (H.23) refrigerado, naturalmente contaminado por *Listeria monocytogenes*: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 20. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de cheiro-verde (H.23c) congelado, naturalmente contaminado por *Listeria monocytogenes*: **I.** Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). **II.** Curva de dissociação.

Para a comparação dos resultados obtidos entre os dois métodos de quantificação foi utilizado o método de análise de variância de um fator (ANOVA), seguido do teste de Kruskal-Wallis, considerando o nível de significância 5% ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das populações de *L. monocytogenes* encontradas nos dois métodos avaliados, tanto para as amostras de couve quanto para as amostras de cheiro-verde.

4.5. Quantificação das amostras artificialmente contaminadas por *L. monocytogenes* (método convencional de cultivo e PCR em tempo real)

Os resultados das análises das amostras de hortaliças minimamente processadas e artificialmente contaminadas com diluições de cultura pura de *L. monocytogenes* ATCC 19114, quantificadas por PCR em tempo real e por método convencional de cultivo, estão mostrados na Tabela 7.

Em todas as amostras de hortaliças artificialmente contaminadas o NMP obtido nos ensaios da PCR em tempo real foi concordante com o obtido quando se realizou a quantificação pelo método convencional de cultivo e, estavam no intervalo de confiança de 95% (SWANSON; PETRAN; HANLIN, 2001) (Tabela 7).

Nas Tabelas 13 a 32 (Apêndice B) e Figuras 21 a 41 estão representados os ensaios de PCR em tempo real para as seis amostras de hortaliças minimamente processadas (alface, cheiro-verde, couve, repolho, acelga e almeirão) artificialmente contaminadas com os níveis de inoculação calculados na semeadura em placa (Conforme dados da Tabela 7). Para todas as amostras analisadas foi necessário diluir os extratos de DNA (1:50 para os extratos de DNA obtidos de 10g do alimento e 1:10 para os extratos de DNA obtidos de 1g do alimento). Todos os ensaios foram realizados com um branco (água Milli-Q), um controle negativo (*L. innocua* ATCC 33090) e um controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 19114).

Para a comparação dos resultados obtidos entre os dois métodos de quantificação foi utilizado o método de análise de variância de um fator (ANOVA), considerando o nível de significância 5% ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das populações de *L. monocytogenes* encontradas nos dois métodos avaliados.

Tabela 7 – Resultados da quantificação de *L. monocytogenes* por número mais provável (NMP) por método convencional de cultivo e PCR em tempo real com *primer* 16S r RNA, em amostras de hortaliças minimamente processadas e artificialmente contaminadas.

Hortaliça	Nível de inoculação (UFC/g do alimento) ¹	NMP por g do alimento (intervalo de confiança de 95%) ²	
		Método convencional	Método da PCR em tempo real ³
Acelga (H 141)	10	2,4 x 10 (3,6 – 1,3 x 10 ²)	2,4 (0,36 – 1,3 x 10)
	80	9,3 x 10 (1,5 x 10 – 3,8 x 10 ²)	2,4 x 10 ² (3,6 x 10 – 1,3 x 10 ³)
	700	2,4 x 10 ³ (3,6 x 10 ² – 1,3 x 10 ⁴)	9,3 x 10 ³ (1,5 x 10 ³ – 3,8 x 10 ⁴)
Repolho (H 144)	10	9,3 x 10 (7 – 2,1 x 10 ²)	9,3 x 10 (7 – 2,1 x 10 ²)
	30	4,3 x 10 ² (7,0 x 10 – 2,1 x 10 ³)	4,3 x 10 ² (7,0 x 10 – 2,1 x 10 ³)
	200	4,3 x 10 ³ (7,0 x 10 ² – 2,1 x 10 ⁴)	4,3 x 10 ³ (7,0 x 10 ² – 2,1 x 10 ⁴)
Couve (H 148)	10	4,3 x 10 (7 – 2,1 x 10 ²)	4,3 x 10 (7 – 2,1 x 10 ²)
	46	9,3 x 10 ² (1,5 x 10 ² x 3,8 x 10 ³)	9,3 x 10 ² (1,5 x 10 ² x 3,8 x 10 ³)
	800	2,4 x 10 ³ (3,6 x 10 ² – 1,3 x 10 ⁴)	2,4 x 10 ⁴ (3,6 x 10 ³ – 1,3 x 10 ⁴)
Alface (H 152)	10	3,9 x 10 (7 – 1,3 x 10 ²)	2,4 x 10 (3,6 – 1,3 x 10 ²)
	70	6,4 x 10 ² (1,5 x 10 – 3,8 x 10 ³)	6,4 x 10 ² (1,5 x 10 – 3,8 x 10 ³)
	424	4,3 x 10 ³ (7,0 x 10 ² – 2,1 x 10 ⁴)	4,3 x 10 ² (7,0 x 10 – 2,1 x 10 ³)
Cheiro-verde (H 156)	12	4,3 x 10 (7 – 2,1 x 10 ²)	2,4 (0,7 – 2,1 x 10)
	116	4,3 x 10 ² (7,0 x 10 – 2,1 x 10 ³)	4,3 (0,7 – 2,1 x 10)
	1040	9,3 x 10 ³ (1,5 x 10 ³ x 3,8 x 10 ⁴)	9,3 x 10 ³ (1,5 x 10 ³ x 3,8 x 10 ⁴)
Almeirão (H 160)	10	4,3 x 10 (7 – 2,1 x 10 ²)	1,1 x 10 (1,5 – 4,8 x 10)
	70	4,3 x 10 ² (7,0 x 10 – 2,1 x 10 ³)	1,1 x 10 ² (1,5 x 10 – 4,8 x 10 ²)
	880	4,3 x 10 ² (7,0 x 10 x 2,1 x 10 ³)	9,3 x 10 ² (1,5 x 10 ² x 3,8 x 10 ³)

¹ Valor calculado por meio da população determinada no inoculo, por enumeração em placas contendo agar soja tripticase adicionado de 0,6% sde extrato de levedura (TSAYE). ²Valores da tabela de NMP de Swanson, Petran e Hanlin (2001); ³ PCR em tempo real desenvolvida com ABSOLUTE™ QPCR SYBR® Green Mix (ABgene, Reino Unido) e *primer* 16S rRNA (DE MARTINIS, DUVALL E HITCHINS 2007); H. legenda para hortaliça e respectivo número de identificação das amostras analisadas.

Figura 21. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de alface (H.152) e cheiro-verde (H.156) sem inoculação por *Listeria monocytogenes*: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 22. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de alface (H.152) artificialmente contaminado por *Listeria monocytogenes*, com nível de inoculação 10 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 23. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de alface (H.152) artificialmente contaminado por *Listeria monocytogenes*, com nível de inoculação 70 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 24. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de alfaca (H.152) artificialmente contaminado por *Listeria monocytogenes*, com nível de inoculação 424 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 25. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de cheiro-verde (H.156) artificialmente contaminado por *Listeria monocytogenes*, com nível de inoculação 12 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 26 – Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de cheiro-verde (H.156) artificialmente contaminado por *Listeria monocytogenes*, com nível de inoculação 116 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 27. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de cheiro-verde (H.156) artificialmente contaminado por *Listeria monocytogenes*, com nível de inoculação 1040 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação

Figura 28. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de repolho (H.144) artificialmente contaminado por *Listeria monocytogenes*, com nível de inoculação 10 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 29. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de repolho (H.144) artificialmente contaminado por *Listeria monocytogenes*, com nível de inoculação 30 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 30. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de repolho (H.144) artificialmente contaminado por *Listeria monocytogenes*, com nível de inoculação 200 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 31. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de acelga (H.141) artificialmente contaminada por *Listeria monocytogenes*, com nível de inoculação 10 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 32. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de acelga (H.141) artificialmente contaminada por *Listeria monocytogenes*, com nível de inoculação 80 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 33. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de acelga (H.141) artificialmente contaminada por *Listeria monocytogenes*, com nível de inoculação 700 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 34. Resultados da alguns tubos de PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de acelga (H.141) e repolho (H.144) sem inoculação por *Listeria monocytogenes*: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 35. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de almeirão (H.160) artificialmente contaminada por *Listeria monocytogenes*, com nível de inoculação 10 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 36. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de almeirão (H.160) artificialmente contaminada por *Listeria monocytogenes*, com nível de inoculação 70 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 37. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de almeirão (H.160) artificialmente contaminada por *Listeria monocytogenes*, com nível de inoculação 880 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 38. Resultados da alguns tubos de PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de almeirão (H.160) e couve (H.148) sem inoculação por *Listeria monocytogenes*: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 39. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de couve (H.148) artificialmente contaminada por *Listeria monocytogenes*, com nível de inoculação 10 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 40. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de couve (H.148) artificialmente contaminada por *Listeria monocytogenes*, com nível de inoculação 46 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

Figura 41. Resultados da PCR em tempo real da análise de extratos de DNA de couve (H.148) artificialmente contaminada por *Listeria monocytogenes*, com nível de inoculação 800 UFC/g do alimento: I. Curva de amplificação do gene que codifica 16S rRNA (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). II. Curva de dissociação.

4.6. Comparação entre o método convencional de cultivo e PCR em tempo real utilizados na quantificação de *L. monocytogenes* em hortaliças minimamente processadas, quanto ao tempo de análise e custo

Na Figura 42 está ilustrada a comparação entre o tempo necessário para a obtenção de resultados positivos e negativos, empregando-se o método convencional de cultivo e PCR em tempo real para quantificação de *L. monocytogenes* em alimentos.

Figura 42. Comparação do tempo necessário para obtenção de resultados positivos e negativos por PCR em tempo real e método convencional de cultivo, para quantificação de *Listeria monocytogenes* em alimentos pela técnica do número mais provável (NMP).

Na Figura 43 está ilustrada a comparação entre o gasto estimado com material de consumo necessário para a obtenção de resultados positivos e negativos, empregando-se o método convencional de cultivo (R\$ 390,7) e PCR em tempo real (R\$ 185,9) para quantificação de *L. monocytogenes* em uma amostra de alimento. Não foram considerados os investimentos em equipamentos necessários para a realização dos ensaios.

Figura 43. Comparação do gasto estimado necessário para a obtenção de resultados positivos e/ou negativos por PCR em tempo real e método convencional de cultivo, para quantificação de *Listeria monocytogenes* em alimentos pela técnica do número mais provável (NMP).

5. DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da qualidade microbiológica das hortaliças minimamente processadas

O controle da presença de microrganismos deteriorantes em hortaliças *in natura* é muito difícil, devido ao seu contato próximo ou direto com o solo, emprego de fertilizantes orgânicos, manipulação humana e procedimentos de irrigação com água inadequada. Porém, o aumento desta população e a introdução de microrganismos patogênicos nestes produtos podem ser minimizados durante as etapas de processamento destes alimentos.

Neste estudo, foi avaliada a qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas através da enumeração de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, bactérias aeróbias psicrótróficas, *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp.

Alguns coliformes podem multiplicar-se sob refrigeração e, por isso, resultados da análise de produtos refrigerados têm que ser avaliados com ressalvas, pois podem não refletir as condições reais de processamento (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

Populações de coliformes totais acima de $1,0 \times 10^3$ NMP/g são consideradas altas para hortaliças minimamente processadas, que foram sanitizadas antes do empacotamento. Grandes populações desses microrganismos podem diminuir a vida de prateleira das hortaliças (BERBARI; PASCHOALINO; SILVEIRA, 2001).

Na literatura existem vários estudos sobre a qualidade microbiológica de hortaliças *in natura* e/ou minimamente processadas, principalmente quanto à presença de microrganismos indicadores de contaminação, destacando-se coliformes termotolerantes e *E. coli*. Na Índia, Pingulkar, Kamat e Borgirwar (2001) encontraram contaminação por coliformes termotolerantes em 65% dos vegetais que

analisaram. No Brasil, Paula et al. (2003) analisaram 30 amostras de saladas de alface servidas em um restaurante de Niterói verificando que 53,3% estavam contaminadas por coliformes termotolerantes com populações superiores a 10^2 NMP por grama do alimento.

A determinação de populações de bactérias da família *Enterobacteriaceae* é também muito utilizada como indicador de contaminação de alimentos. Porém, para Sagoo, Little e Mitchell (2003a), altas populações de bactérias da família *Enterobacteriaceae* em saladas de vegetais são comuns, e afirmam que a determinação de populações de microrganismos indicadores fecais, tais como *E. coli*, é mais adequada para avaliar a contaminação e qualidade higiênico-sanitária destes produtos.

É preocupante a confirmação da presença de *E. coli* em 53,1% das 162 amostras avaliadas neste estudo (Tabela 5), uma vez que a presença desta bactéria em vegetais minimamente processados pode indicar contaminação do alimento por enteropatógenos.

Outros pesquisadores também detectaram *E. coli* em vegetais. Na Espanha, Abadias et al. (2008), detectaram *E. coli* em 27 (11,4%) de 236 amostras de vegetais frescos picados analisadas. No Reino Unido, Sagoo et al. (2003b) analisaram 3843 amostras de salada de vegetais prontas para o consumo e encontraram 52 (1,3%) amostras contaminadas por *E. coli*.

De acordo com os resultados apresentados neste estudo (Tabela 8; Apêndice A) a maioria das amostras de hortaliças minimamente processadas analisadas apresentou populações de bactérias aeróbias psicrotróficas maior que 5,0 log UFC/g.

Estes dados indicaram que a qualidade microbiológica das amostras de hortaliças analisadas, quanto à presença de bactérias aeróbias psicrotróficas é muito baixa, pois a maioria das amostras foi analisada no início de sua vida de prateleira. Não houve diferença estatisticamente significativa ($P=1,000$) entre as médias das populações de bactérias aeróbias psicrotróficas presentes nas diferentes hortaliças quando analisadas em diferentes tempos de prateleira.

A porcentagem de hortaliças minimamente processadas contaminadas por *Salmonella* sp. nas 162 amostras analisadas foi baixa. Porém, este patógeno foi isolado de um único tipo de hortaliça (almeirão), sugerindo a necessidade de maior atenção no processamento, desinfecção e empacotamento deste alimento.

No Brasil, Bruno et al. (2005), avaliaram a qualidade microbiológica de 30 amostras de frutas, tubérculos e hortaliças minimamente processadas comercializadas em Fortaleza-CE e detectaram a presença de *Salmonella* sp. em 14 (46,7%) amostras. Em outro estudo, Fröder et al. (2007) verificaram a qualidade microbiológica de 133 amostras de hortaliças folhosas minimamente processadas, comercializadas na cidade de São Paulo e, relataram que 4 (3%) das amostras estavam contaminadas por *Salmonella* sp.

A presença de *Salmonella* sp. em hortaliças minimamente processadas é relevante, uma vez que os produtos são destinados à mesa do consumidor direto do ponto de venda. Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do estado de São Paulo (SVS) referentes ao período de 1999 a 2004 (SVS, 2005), 34,7% dos surtos de ETAs com etiologia identificada foram causados por *Salmonella* sp.

5.2. Ocorrência de *Listeria* sp. nas amostras de hortaliças minimamente processadas

Segundo Szabo; Scurrah e Burrows (2000), a ausência de tratamentos letais, abuso de temperatura e a embalagem para aumentar a vida de prateleira dos vegetais minimamente processados pode não eliminar a microbiota autóctone ou mesmo oferecer condições e tempo necessários para a sobrevivência e multiplicação de bactérias psicrotróficas patogênicas, tais como *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolítica* e *Aeromonas hydrophila*. Dentre estes patógenos, destaca-se *L. monocytogenes*, que é uma bactéria de grande interesse em saúde pública, por causar quadros graves de infecção, com alto índice de letalidade.

A ocorrência de *L. monocytogenes* nas hortaliças analisadas neste trabalho foi baixa (2/162). Resultados semelhantes foram encontrados nos Estados Unidos da América (EUA) por Lin, Fernando e Wei (1996), que relataram o isolamento de *L. monocytogenes* de uma (1,6%) amostra de salada, dentre 63 amostras analisadas (alface americana, tomate, cenoura, repolho roxo e pepino). No Japão, Kaneko et al. (1999) pesquisaram *Listeria* sp. em 196 amostras de equipamentos e ambiente de duas fábricas de processamento de vegetais prontos para o consumo, localizadas no subúrbio de Tóquio e não foi detectada a presença de listérias.

Para alguns autores, a obtenção de resultados negativos pode não representar a realidade, pois a população de *Listeria* sp. encontrada nos alimentos, geralmente está em número inferior ao da microbiota acompanhante, o que pode dificultar a sua detecção, ou a bactéria pode apresentar injúria subletal e não conseguir recuperar-se nos caldos de enriquecimento. Há também

resultados mostrando que os meios de enriquecimento empregados podem permitir uma maior multiplicação de *L. innocua* em detrimento de *L. monocytogenes* (BRUHN; VOGEL; GRAM, 2005).

A detecção de apenas duas espécies de *Listeria* (*L. innocua* e *L. monocytogenes*) neste estudo confirma o relato prévio de Farber e Peterkin (1991), de que estas duas espécies são as mais comumente encontradas em alimentos.

Estudos de detecção de *L. monocytogenes* em amostras de hortaliças consumidas no Brasil são escassos. Porto e Eiroa (2001) analisaram 250 amostras de diversas hortaliças, produzidas em nosso país e encontraram *L. monocytogenes* em alface, salsa e agrião, perfazendo um total de 3,2% de amostras positivas para esta espécie. Fröder et al. (2007) realizaram a pesquisa de *Listeria* sp. em 181 amostras de hortaliças folhosas minimamente processadas coletadas no município de São Paulo e detectaram *Listeria* sp. em 4 (2,2%) do total de amostras analisadas, sendo que *L. monocytogenes* foi encontrada em 1 (0,6%) amostra de espinafre, *L. innocua* em 2 (0,9%) amostras de agrião e *L. welshimeri* em 1 (0,6%) amostra de alface mimosa.

É interessante ressaltar que neste estudo, desenvolvido durante um ano, os microrganismos patogênicos (*Salmonella* sp. e *L. monocytogenes*) presentes nas amostras de hortaliças minimamente processadas foram isolados na primavera (dados não mostrados), sugerindo que nos meses de chuva os cuidados com este tipo de alimento devem ser mais rigorosos.

O risco de veiculação de *L. monocytogenes* através de vegetais minimamente processados, apesar de estar sendo considerado baixo por alguns órgãos que regulamentam critérios microbiológicos, exige atenção. Muitas

pesquisas ainda precisam ser conduzidas na tentativa de serem obtidos produtos minimamente processados com qualidade sensorial e nutricional adequadas e, seguros do ponto de vista microbiológico. A educação dos consumidores, especialmente de grupos de risco, a respeito do manuseio seguro de alimentos e práticas de sanitização corretas, podem contribuir para a diminuição do risco de ocorrência de listeriose em humanos (LATORRE, 2007).

5.3. Quantificação das amostras de hortaliças minimamente processadas, naturalmente e artificialmente contaminadas por *L. monocytogenes* por método convencional de cultivo (NMP/g)

Segundo Rodrigues - Lázaro et al. (2007), a enumeração de microrganismos patogênicos é um dos principais aspectos da microbiologia de alimentos, especialmente por fornecer resultados úteis para a avaliação quantitativa de risco.

O método convencional de quantificação de *L. monocytogenes* tem a vantagem de permitir detecção do patógeno desejado mesmo quando presente em baixas populações e em matrizes alimentícias com grande número de microrganismos acompanhantes. Por outro lado, tem a desvantagem de ser trabalhoso, necessitar de vários dias para confirmação de resultados e não viabilizar a realização de várias amostras no mesmo dia (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005; GIACCONE; OTTAVIANI, 2007; INGIANNI et al., 2001; NORTON, 2002; OTERO; GARCÍA-LÓPEZ; MORENO, 1998; RODRÍGUES-LÁZARO et al., 2007)

Neste estudo, as populações de *L. monocytogenes* encontradas nas amostras naturalmente contaminadas de couve e cheiro-verde minimamente

processadas, após sete dias de refrigeração, estavam fora de padrões aceitáveis por alguns países, tais como EUA e Itália que aplicam a política de “tolerância zero” (ausência de *L. monocytogenes* em 25g do alimento) para produtos prontos para o consumo e, Alemanha e França em que a tolerância é abaixo de 10^2 UFC de *L. monocytogenes* por grama do alimento (FRANCIS; THOMAS; O’BEIRNE, 1999; NØRUNG et al., 2000; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007b).

No Brasil, a Resolução - RDC nº 12 da ANVISA (BRASIL, 2001) aplica a política de “tolerância zero” (ausência em 25g), para *L. monocytogenes* em queijos de média, alta e muito alta umidade, mas não contempla outros alimentos.

As diferenças nas populações de *L. monocytogenes* encontradas nas amostras refrigeradas e congeladas (Tabela 6), podem ter sido causadas pela multiplicação da bactéria ou pela distribuição não homogênea do patógeno na amostra (Tabela 8, Apêndice A).

Neste estudo, a partir de apenas duas amostras de hortaliças foi isolada *L. monocytogenes*. Portanto, para realização da comparação dos métodos de análise convencional e por PCR em tempo real, foram utilizadas seis diferentes hortaliças artificialmente contaminadas, com populações que variaram de 10 a 1040 UFC por grama de alimento (Tabela 7).

5.4. Quantificação das amostras de hortaliças minimamente processadas, naturalmente e artificialmente contaminadas por *L. monocytogenes* por PCR em tempo real (NMP/g)

Neste estudo, para a enumeração de *L. monocytogenes* nas amostras de hortaliças através da PCR em tempo real, foi utilizado como referência o método de De Martinis, Duvall e Hitchins (2007), com algumas modificações.

Foram testadas várias concentrações de *primers* e várias preparações comerciais de misturas de reação para PCR em tempo real. Na reação otimizada, foi utilizado um volume final de 25 µL, constituídos de 12,5 µL de ABSOLUTE™ QPCR SYBR® Green Mix, 4 µL de extrato de DNA e 1,25 µL de solução de *primer* (0,25 µM de *primer* L-1 e 0,25 µM de *primer* L-2).

Segundo Wang, Cao e Johnson (1992), os *primers* L-1 e L-2 foram específicos para a detecção de *L. monocytogenes* por PCR convencional. Por outro lado, Aznar e Alarcón (2002), obtiveram resultados discordantes, quando testaram a especificidade dos *primers* desenvolvidos por Wang, Cao e Johnson (1992). Aznar e Alarcón relataram que houve a presença de bandas referentes ao produto de amplificação dos *primers* L-1 e L-2 na eletroforese em gel dos produtos de PCR para outras cepas de *Listeria*, além de *L. monocytogenes*.

Neste estudo, foram realizados ensaios da PCR em tempo real com outras espécies de *Listeria* e com outros microrganismos Gram positivos e Gram negativos (Figuras 13 e 15). A especificidade dos produtos da PCR em tempo real foi documentada em gel de agarose e havia único *amplicon*, de 70pb (Figuras 14 e 16), específico para *L. monocytogenes*.

Nos ensaios de PCR em tempo real com culturas puras de *L. monocytogenes* foram obtidas temperaturas de fusão dos amplicons (T_m) variando de 79 a 79,40 (Figura 13), enquanto que para as amostras de hortaliças a T_m variou de 78,20 a 80,10. Estes resultados são compatíveis com o valor de 80,55°C estimado teoricamente (DE MARTINIS, DUVALL; HITCHINS, 2007; WANG; CAO; JOHNSON, 1992).

Segundo informações do fabricante do ABSOLUTE™ QPCR SYBR® Green Mix, a temperatura de fusão pode variar dependendo do equipamento e do

software utilizados. Foi observado neste estudo que diferentes reagentes e concentrações de *primers* também podem influenciar nos resultados obtidos, portanto é necessária uma otimização cuidadosa para permitir a detecção seletiva de *L. monocytogenes*.

Na Figura 10 está mostrado que o método da PCR em tempo real, nas condições desenvolvidas neste estudo, teve um limite de detecção de $1,0 \times 10^3$ cópias de DNA, sendo adequado para utilização em conjunto com a técnica do NMP. Nos caldos de cultura de enriquecimento em 48 horas, *L. monocytogenes*, provavelmente atinge populações maiores que $1,0 \times 10^3$ UFC.

Para algumas amostras naturalmente contaminadas foram obtidas populações de *L. monocytogenes* menores em números absolutos em comparação com o método de cultura convencional (Tabela 6). Por outro lado, o resultado de todos os ensaios estava dentro do intervalo de confiança de 95% da técnica do NMP (SWANSON; PETRAN; HANLIN, 2001). A análise das populações médias de *L. monocytogenes* nas diferentes amostras por análise de variância de um fator (ANOVA), seguida do teste de Kruskal-Wallis, demonstrou que não havia diferença estatisticamente significativa entre o método de cultivo convencional e a PCR em tempo real.

Os dois métodos (convencional e PCR em tempo real) empregados para determinação quantitativa de *L. monocytogenes* em hortaliças artificialmente contaminadas, também forneceram resultados semelhantes, sendo que resultados idênticos foram obtidos para as amostras de repolho (Tabela 7). Todos os resultados foram concordantes considerando-se o intervalo de confiança de 95% da técnica do NMP (SWANSON; PETRAN; HANLIN, 2001) e não houve

diferença estatisticamente significativa, conforme demonstrado por análise de variância de um fator (ANOVA).

Um dos principais problemas da aplicação da PCR para pesquisa de microrganismos em alimentos é a presença de substâncias inibidoras na amostra, as quais podem ser co-extraídas com o DNA e causar falha na reação de amplificação e levar a resultados falsos negativos (AMAGLIANI et al., 2007). Segundo Blodgett (2006), para alguns microrganismos em algumas matrizes alimentícias, parece haver fatores que reduzem a eficiência da detecção do microrganismo alvo (organismos competidores ou componentes inibitórios).

Alguns pesquisadores (AMAGLIANI et al., 2007; LIU, 2008; RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2007; SMITH; MAXWELL, 2007) destacaram a importância dos métodos de extração de DNA para melhorar a especificidade e aumentar a sensibilidade da PCR.

Amagliani et al. (2007) testaram diferentes tipos de extração de DNA (três *kits* comerciais, extração com fenol-clorofórmio e lise por método de ebulição). Naquele estudo, foi demonstrado que o método de ebulição pode ser o método mais conveniente de extração de DNA, por ser prático, rápido, não utilizar reagentes tóxicos e resultar em grande quantidade de DNA. Por outro lado, devem ser tomados cuidados quando se espera que a matriz alimentícia esteja cotaminada com baixas populações do microrganismo alvo, devido à existência de diferentes substâncias na matriz alimentícia que podem causar inibição da PCR.

Neste estudo, foi verificado (Tabelas 9, 10, 18 a 19) que números menores de tubos positivos podem ocorrer na presença de maiores quantidades de amostra (10 e 1 grama de alimento). O maior problema encontrado foi a

interferência do pigmento verde das hortaliças analisadas, principalmente para as hortaliças com pigmentação mais forte (couve, almeirão e cheiro-verde), sendo necessário realizar diluições antes da análise por PCR.

As diluições do DNA (1:50) (Tabelas 20 a 32) ajudaram a melhorar a detecção, mas em algumas amostras ainda foram observadas curvas de amplificação do DNA de *L. monocytogenes* na PCR em tempo real com formas irregulares e com ponto de fusão (T_m) um pouco diferente daquele calculado teoricamente (item 4.3 e Figura 13).

Recentemente, ensaios de PCR em tempo real foram desenvolvidos (RODRIGUES-LÁZARO, 2004; SOMMER; KASHI, 2003), baseados na detecção de genes de virulência de *L. monocytogenes* e testados em uma série de alimentos. Alguns destes ensaios eram quantitativos sem enriquecimento prévio. Neste estudo a quantificação por PCR em tempo real foi realizada após um período de enriquecimento de 48 horas pelo NMP, pois segundo Rodrigues-Lázaro et al (2004), ensaios que incluem algum tipo de enriquecimento são mais sensíveis.

Não é de nosso conhecimento publicação sobre método de enumeração de *L. monocytogenes* por PCR em tempo real, baseada na técnica de NMP, em alimentos naturalmente contaminados.

Berrada et al., 2006, realizaram estudo de presença ou ausência de *L. monocytogenes*, em 77 diferentes tipos de saladas servidas em restaurantes de Valencia (Espanha), por PCR em tempo real e por método convencional de cultivo, obtendo três amostras positivas entre as 77 analisadas. Aqueles autores relataram que os resultados foram similares para os dois métodos estudados.

Rantsiou et al. (2008), também utilizaram a técnica da PCR em tempo real para quantificar *L. monocytogenes* em diferentes amostras de alimentos coletadas em supermercados e em estabelecimentos de pequenos produtores do noroeste da Itália. Naquele estudo, os pesquisadores analisaram 66 amostras e detectaram quatro amostras positivas sem prévio período de enriquecimento e, nove amostras positivas após enriquecimento a 37°C/24 horas, com uma população de $4,0 \times 10^3$ UFC/g.

5.5. Comparação entre PCR em tempo real e método convencional de cultivo para enumeração por NMP de *L. monocytogenes* em hortaliças minimamente processadas.

A escolha de um método de análise microbiológica deve ser baseado nos objetivos do estudo, condições laboratoriais e financeiras. Além disso, para detecção de pequenas populações, devem ser considerados parâmetros de validação como precisão e limite de quantificação. É ainda desejável que haja redução na geração de resíduos tóxicos, especialmente para laboratórios que não contam com sistema de descarte deste tipo de material.

Dentre os dois métodos avaliados neste estudo, o mais simples, rápido e menos oneroso foi a PCR em tempo real, sem considerar o investimento inicial necessário para a aquisição de equipamentos (Figuras 42 e 43).

Segundo Rodrigues-Lázaro et al (2004) a capacidade do método de PCR em tempo real diferenciar rapidamente *L. monocytogenes* de outras espécies de *Listeria* é relevante para as indústrias alimentícias, na prevenção de recolhimentos desnecessários de grandes quantidades de produtos alimentícios.

Dados quantitativos sobre *L. monocytogenes* em hortaliças minimamente processadas ainda são escassos e não existe consenso sobre metodologias para quantificação desta bactéria em diferentes matrizes alimentícias. Os resultados deste estudo contribuíram para demonstrar a viabilidade da aplicação da PCR em tempo real para a enumeração de *L. monocytogenes* por NMP em hortaliças, e o mesmo método poderá ser testado para outras matrizes alimentícias.

6. Conclusões

1. Apesar da baixa ocorrência, a presença de *L. monocytogenes* nas hortaliças minimamente processadas indica que grupos da população com maior risco de adquirir listeriose devem ser orientados a não considerar os produtos prontos para o consumo, principalmente, por ter sido evidenciado que houve multiplicação do patógeno em hortaliça refrigerada.
2. O método de NMP em conjunto com PCR em tempo real baseado em genes que codificam 16S rRNA permitiu a enumeração de *L. monocytogenes* em amostras de hortaliças minimamente processadas, sendo recomendável realizar diluições das amostras de tubos múltiplos contendo maiores concentrações de alimento (10g e 1g) para prevenir a interferência de componentes da matriz alimentícia na PCR.
3. O método da PCR em tempo real apresentou desempenho comparável ao método convencional de cultivo, foi de fácil execução e reduziu o tempo necessário para a obtenção de resultados.
4. A presença de *Salmonella* sp. em hortaliças prontas para o consumo, mesmo em baixas populações, indica potencial risco à saúde dos consumidores.
5. A maioria das amostras de hortaliças minimamente processadas não apresentava boa qualidade microbiológica, evidenciada pelas grandes populações de microrganismos indicadores de condições higiênico-sanitárias encontradas.

--- *7. Referências*[☆]

[☆] De acordo com: Universidade de São Paulo/Sistemas Integrados de Bibliotecas/Grupo DeTeses. Diretrizes para apresentação de dissertações de tese da USP: documento eletrônico e impresso. Vânia M. B. de Oliveira Funaro, coord. et al. São Paulo: SIBi USP, 2004.

ABADIAS, M.; USALL, J.; ANGUERA, M.; SOLSONA, C.; VIÑAS, I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 123, n. 1-2, p. 121-129, mar. 2008.

ABRAM, M.; SCHLÜTER, D.; VUCKOVIC, D.; WRABER, B.; DORIC, M.; DECKERT, M. Murine model of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 35, n. 3, p.177-182, abr. 2003.

AGUADO, V.; VITAS, A.I.; GARCÍA-JALÓN, I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 90, n. 3, p. 341-347, fev. 2004.

ALLERBERGER, F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 35, n. 3, p. 183-189, abr. 2003.

ALVES, V.F.; DE MARTINIS, E.C.P.; DESTRO, M.T.; VOGEL, B.F.; GRAM, L. Antilisterial activity of a *Carnobacterium piscicola* isolated from Brazilian smoked fish (surubim [*Pseudoplatystoma* sp.]) and its activity against a persistent strain of *Listeria monocytogenes* isolated from surubim. **J. Food Prot.**, v. 68, n. 10, p. 2068-2077, out. 2005.

AMAGLIANI, G.; GIAMMARINI, C.; OMICCILOLO, E.; BRANDI, G.; MAGNANI, M. Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different DNA extraction methods. **Food Control**, v. 18, n. 9, p. 1137-1142, set. 2007.

ANDREWS, W.H.; HAMMACK, T.S. Food And Drug Administration (FDA)/Center for Food Safety & Applied Nutrition (CFSAN). 2003. *Salmonella*. **Bacteriological Analytical Manual**. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>>. Acesso em: 27. jul. 2006.

ANDREWS, W.H.; FLOWERS, R.S.; SILLIKER, J.; BAILEY, J.S. *Salmonella*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (eds). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington, DC: American Public Health Association (APHA), 2001, p. 357-380.

ARAGON-ALEGRO, L.C.; WITTMANN, R.M.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D. G.M., DESTRO, M.T. Detection of *Listeria* sp. in meat and meat products using Tecra *Listeria* visual immunoassay and biocontrol visual immunoprecipitate assay for *Listeria* immunoassays a cultural procedure. **J. Rapid Meth. Autom. Microbiol.**, v. 13, n. 3, p. 204-212, set. 2005.

AZNAR, R.; ALARCON, B. On the specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in food: a comparison of published primers. **System. Appl. Microbiol.**, v. 25, p. 109-119, 2002.

BAKARDJIEV, A.I.; THERIOT, J.A.; PORTNOY, D.A. *Listeria monocytogenes* traffics from maternal organs to the placenta and back. **PLoS Pathog.**, v. 2, n. 6, p. 0623-0631, jun. 2006.

BARBUTI, S.; MERCADANTI, I.; MUTTI, P.; QUINTAVALHA, S. Determinazione rápida di *Listeria monocytogenes* in prodotti carnei: valutazione del método Gene-track®. **Ind. Cons.**, v.75, p.3-11, 2000.

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

BERBARI, S.A.G.; PASCHOALINO, J.E.; SILVEIRA, N.F.A. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 21, n. 2, p. 197-201, maio/ago. 2001.

BERRADA, H.; SORIANO, J.M.; PICÓ, Y.; MAÑES, J. Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real time quantitative PCR. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 107, n. 2, p. 202-206, mar. 2006.

BILLE, J.; ROCOURT, J.; SWAMINATHAN, B. *Listeria*, *Erysipelotrix*, and *Kurthia*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. (eds). **Manual of Clinical Microbiology**. 7ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2000. p. 346-356.

BLODGETT, R. Food and Drug Administration (FDA)/Center for Food Safety & Applied Nutrition (CFSAN). 2006. Most Probable Number from serial dilutions. **Bacteriological Analytical Manual**. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>>. Acesso em: 08. out. 2006.

BRACKETT, R.E.; SPLITTSTOESSER, D.F. Fruits and vegetables. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (eds). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association (APHA), 2001, p. 515-520.

BRASIL. Resolução - RDC nº 12, de 02 jan. 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 45-53.

BRECHT, J.K.; SALTVEIT, M.E.; TALCOTT, S.T.; MORETTI, C.L. Aspectos Gerais da Tecnologia de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças: Alterações metabólicas. In: MORETTI, C.L. (ed). **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças** Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2007, p. 41-99.

BRUNO, L.M.; QUEIROZ, A.A.M.; ANDRADE, A.P.C.; VASCONCELOS, N.M.; BORGES, M.F. Avaliação microbiológica de hortaliças e frutas minimamente processadas comercializadas em Fortaleza (CE). **B. CEPPA**, v. 23, n. 1, p. 75-84, jan./jun. 2005.

BRUHN, J.B.; VOGEL, B.F.; GRAM, L. Bias in the *Listeria monocytogenes* enrichment procedure: lineage 2 strains outcompete lineage 1 strains in University of Vermont Selective Enrichments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 2, p. 961-967, fev. 2005.

CHEN, Y.; ROSS, W.H.; GRAY, M.J.; WIEDMANN, M.; WHITING, R.C.; SCOTT, V.N. Attributing risk to *Listeria monocytogenes* subgroups: dose response in relation to genetic lineages. **J. Food Prot.**, v. 69, n. 2, p. 335-344, fev. 2006.

CHURCHILL, R.L.T.; LEE, H.; HALL, J.C. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. **J. Microbiol. Meth.**, v. 64, n. 2, p. 141-170, fev. 2006.

COSSART, P. Listeriology (1926-2007): the rise of model pathogen. **Microb. Infect.**, v. 9, n. 10, p. 1143-1146, ago. 2007.

D'AOUST, J-Y. Current Foodborne Pathogens: *Salmonella* In: STORRS, M.; DEVOLUY, M-C.; CRUVEILLER, P. (eds). **Food Safety Handbook: Microbiological Challenges**. França. bioMérieux Education, 2007, p. 128-141.

DE MARTINIS, E. C. P.; DUVALL, R.E.; HITCHINS, A. D. Real Time PCR detection of 16S rRNA genes speeds Most-Probable-Number enumeration of foodborne *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, v. 70, n. 7, p. 1650-1655, jun. 2007.

DESTRO, M.T.; SERRANO, A.M.; KABUKI, D.I. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, v. 2, n. , p. 110-112, abr. 1991.

DONNELLY, C.W. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. **Nut. Rev.**, v. 59, n. 6, p. 183-194, jun. 2001.

DUVALL, R.E.; EKLUND, M.; TRAN, T.T.; HITICHINS, A.D. Improved DNA probe detection of *Listeria monocytogenes* in enrichment culture after physica-chemical fractionation. **J. AOAC Int.**, v. 89, n. 1, p. 172-179, 2006.

ELLS, T.C.; HANSEN, L.T. Strain and growth temperature influence *Listeria* spp. attachment to intact and cut cabbage. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 111, n. 1, p. 34-42, ago. 2006.

ENTIS, P.; FUNG, D.Y.C.; GRIFFITTS, M.W.; MCLNTYRE, L.; RUSSEL, S.; SHARPE, A.N.; TORTORELLO, M.L. Rapid methods for detection, identification, and enumeration In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (eds). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association (APHA), 2001, p. 89-126.

FARBER, J.M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **J. Food Prot.**, v. 59, n. 10, p. 1091-1101, out. 1996.

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

FANTUZZI, E.; PUSCHMANN, R.; VENETTI, M.C.D. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 2, p. 207-211, abr./jun. 2004.

FELDSINE, P.; ABEYTA, C.; ANDREWS, W.H. AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. **J. AOAC Int.**, v. 85, n. 5, p. 1187-1200, set. 2002a.

FELDSINE, P.T.; LINEU, A.H.; LEUNG, S.C.; MUI, L.A. Method extension study to validate applicability of AOAC Official Method 996.14 Assurance[®] Polyclonal Enzyme immunoassay for detection of *Listeria momocytogenes* and related *Listeria* spp. from environmental surfaces: collaborative study. **J. AOAC Int.**, v. 85, n. 2, p. 460-469, mar. 2002b.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA)/FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICES (FSIS). 2003. **Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods**. Disponível em: <<http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.htm/>>. Acesso em: 3 ago. 2006.

FRANCIS, G.A.; THOMAS, C.; O'BEIRNE, D. The microbiological safety of minimally processed vegetables. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v. 34, n. 1, p. 1-22, fev. 1999.

FREITAS, E.I.; LEMOS, A.A.; MARIN, V.A. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 11, n. 4, p. 1073-1083, out./dez. 2006.

FRÖDER, H.; MARTINS, C.G.; SOUZA, K.L.O.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Minimally processed vegetable salads: microbial quality evaluation. **J. Food Prot.**, v. 70, n. 5, p. 1277-1280, maio. 2007.

GAHAN, C.G.M.; HILL, C. A Review: Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. **J. Appl. Microbiol.**, v. 98, n. 6, p. 1345-1353, jun. 2005.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P.M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, n. 5, p. 851-875, nov. 2005.

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

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 386-401, dez. 2001.

GRAY, M.J.; ZADOKS, R.N.; FORTES, E.D.; DOGAN, B.; CAI, S.; CHEN, Y.; SCOTT, V.N.; GOMBAS, D.E.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n.10, p. 5833-5841, out. 2004.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Res.**, v. 6, p. 986-994, out.1996.

HITCHINS, A.D. Food and Drug Administration (FDA)/Center for Food Safety & Applied Nutrition (CFSAN). 2003. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. **Bacteriological Analytical Manual**. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>>. Acesso em: 27 jul. 2006.

HITCHINS, A.D.; JINNEMAN, K.C.; YOSHITOMI, K.J.; BLACKSTONE, G.M.K.; THAMMASOUK, K.; JOHSON, J.M.; FEIST, M.D. Multiplex real – time PCR to simultaneously detect *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* from a variety of food enrichments. In: International Symposium on Problems of Listeriosis, 15, 2004. Uppsala, Sweden. **Book of Abstract the XV ISOPOL**, 2004.

HOF, H. History and epidemiology of listeriosis. **FEMS Imm. Med. Microbiol.**, v. 35, p. 199-202, abr. 2003.

HOFER, E.; REIS, C.M.F.; HOFER, C.B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 1, p. 32-37, jan./fev.2006.

HOROTA, D.M.; NOVO, A.M.F.S.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Detecção de *Listeria Monocytogenes* pelo PCR em tempo real – *Lightcycler System* e pelo método clássico. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 23, 2005. Santos, SP. **CD-ROM**.

HOUGH, A.J.; HARBINSON, S.A.; SAVILL, M.G.; MELTON, L.D.; FLETCHER, G. Rapid enumeration of *Listeria Monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction. **J. Food Prot.**, v. 65, n. 8, p. 1329-1332, ago. 2002.

INGIANNI, A.; FLORIS, M.; PALOMBA, P; MADEDDU, M.A.; QUARTUCCIO, M.; POMPEI, R. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in foods, by a combination of PCR and DNA probe. **Mol. Cell. Probes**, v. 15, n. 5, p. 275-280, out. 2001.

JOHANNESSEN, G.S.; LONCAREVIC, S.; KRUSE, H. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 77, n. 3, p. 199-204, ago. 2002.

JOUE, J-L. Food Safety: A customized approach. In: STORRS, M.; DEVOLUY, M-C.; CRUVEILLER, P. (eds). **Food Safety Handbook: Microbiological Challenges**. França. bioMérieux Education, 2007, p. 198-209.

JOTHIKUMAR, N.; WANG, X. ; GRIFFITHS, M.W. Real-time multiplex SYBER Green I – based assay for simultaneous detection of *Salmonella* serovars and *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, v. 66, n. 11, p. 2141-2145, nov. 2003.

JUNG, Y.S.; FRANK, J.F.; BRACKETT, R.E.; CHEN, J. Polimerase Chain Reaction detection of *Listeria monocytogenes* on frankfurters using oligonucleotide primers targeting the genes encoding internalin AB. **App. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 2, p. 237-241, fev. 2003.

KANEKO, K.-I.; HAYASHIDAMI, H.; TAKAHASHI, K.; SHIRARI, Y.; LIMAWONGPRANEE, S.; OGAWA, M. Bacterial contamination in the environment of food factories processing ready-to-eat fresh vegetables. **J. Food Prot.**, v.62, n.7, p. 800-804, jul. 1999.

KENNEDY, J.; WALL, P. Food Safety Challenges. In: STORRS, M.; DEVOLUY, M-C.; CRUVEILLER, P. (eds). **Food Safety Handbook: Microbiological Challenges**. França. bioMérieux Education, 2007, p. 8-19.

KERDAHI, K.F.; ISTAFANOS, P.F. Rapid determination of *Listeria monocytogenes* by automated Enzyme-Linked Immunoassay and nonradioactive DNA probe. **J. AOAC Int.**, v. 83, n. 1, p. 86-88, jan. 2000.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (eds). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association (APHA), 2001, p. 69-82.

LAMMERDING, A.M.; FAZIL, A.M.; PAOLI, G.M. Microbial food safety risk assessment. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (eds). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association (APHA), 2001, p. 267-281.

LANDGRAF, M. Microrganismos indicadores. In: FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. (eds). **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 27-31.

LATORRE, L.; PARISI, A.; FRACCALVIERI, R.; NORMANNO, G.; LA PORTA, M.C.N.; GOFFREDO, E.; PALAZZO, L.; CICCARESE, G.; ADDANTE, N.; SANTAGADA, G. Low prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods from Italy. **J. Food Prot.**, v.70, n. 6, p.1507-1512, 2007.

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

LIU, D. Preparation of *Listeria monocytogenes* specimens for molecular detection and identification. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 122, n. 3, p. 229-242, mar. 2008.

McLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R.T.; SMERDON, W.J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 92, n. 1, p. 15-33, abr. 2004.

MENG, J.; DOYLE, M.P. Introduction. Microbiological food safety. **Microb. Infect.**, v. 4, n. 4, p. 395-397, abr. 2002.

MORETTI, C.L. Aspectos Gerais da Tecnologia de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças: Panorama do processamento mínimo de frutas e hortaliças. In: MORETTI, C.L. (ed). **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças** Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2007, p. 25-40.

MOURA, S.M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M. Occurrence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brasil. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 19, n. 3, p. 229-237, aug. 1993.

MOURA, S.M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M.; BRANCACCIO, R.M. Low cost illumination system for *Listeria* spp. research. **Rev. Microbiol.**, v. 22, n. 1, p. 75-76, 1991.

NIEDERHAUSER, C.; CANDRIAN, U.; HOFELEIN, C.; JERMINI, M.; BUHLER, H.P.; LUTHY, J. Use of Polymerase Chain Reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, n. 5, p. 1564-1568, maio. 1992.

NORTON, D.M. Polymerase Chain Reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples. **J. AOAC Int.**, v. 85, n. 2, p. 505-515, 2002.

NØRUNG, B. Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 62, n. 3, p. 217-221, dez. 2000.

O' GRADY, J.; SEDANO-BALBÁS, S.; MAHER, M.; SMITH, T.; BARRY, T. Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssr A* gene, a novel diagnostic target. **Food Microbiol.**, v. 25, n. 1, p. 75-84, fev.2008.

OLIVEIRA, F.S.; FRANCO, B.D.G.M. Análise de risco microbiológico: a nova ferramenta para gestão da segurança alimentar. **Hig. Alim.**, v. 17, n. 108, p.14-20, maio. 2003.

OTERO, A.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L.; MORENO, B. Rapid microbiological methods in meat and meat products. **Meat Sci.**, v. 49, Supplement 1, p. S179-S189, 1998.

OXOID, 2007. Rapid Food Tests - OXOID LISTERIA RAPID TEST. Disponível em: <http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=FT0405&c=UK&lang=ENdo> Acesso em: 23 mar. 2007.

PAULA, P.; RODRIGUES, P.S.S.; TÓRTORA, J.C.O.; UCHÔA, C.M.A.; FARAGE, S. Contaminação microbiológica e parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) de restaurante *self-service*, de Niterói, RJ. **Rev. Socied. Bras. Méd. Trop.**, v. 36, n. 4, p. 535-537, jul.-ago. 2003.

PERRIN, M.; BEMER, M.; DELAMARE, C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 11, p. 5308-5309, nov. 2003.

PINGULKAR, K.; KAMAT, A.; BONGIRWAR, D. Microbiological quality of leafy vegetables, salad components and ready-to-eat salads: an evidence of inhibition of *Listeria monocytogenes* em tomatoes. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v. 52, n. 1, p. 15-23, jan. 2001.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; BRENNER, F.W.; GHEESLING, L.L. Supplement 2000 (n. 44) to the Kauffmann-white scheme. **Res. Microbiol.**, v. 152, n. 10, p. 907-909, dez. 2001.

PORTO, E.; EIROA, M.N.U Occurrence of *Listeria monocytogenes* in vegetables. **Dairy, Food Environ. Sanit.**, v. 21, n. 4, p. 282-286, 2001.

RASMUSSEN, R. **Quantification on the LightCycler® Instrument**. Disponível em: <http://www.idahotech.com/lightcycler_u/lectures/quantification_on_lc.htm>. Acesso em: 31 out. 2006.

RANTSIU, K.; ALESSANDRIA, V.; URSO, R.; DOLCI, P.; COCOLIN, L. Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 121, n. 1, p. 99-105, jan. 2008.

ROCOURT, J.; BILLE, J. Foodborne listeriosis. **World Health Statistics Quaterly**, v. 50, p. 67-73, 1997.

ROCOURT, J.; JACQUET, C.; REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. **Int. J. Food Microbiol.** v. 62, n. 3, p. 197-209, dez. 2000.

RODRIGUES, D.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T. Evaluation of two commercial methods for the detection of *Listeria* sp. and *Listeria monocytogenes* in chicken nugget processing plant. **Can. J. Microbiol.**, v. 48, n. 3, p. 275-278, mar. 2002.

RODRÍGUES-LÁZARO, HERNÁNDEZ, M.; PLA, M. Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 233, n. 2, p. 257-267, abr. 2004.

RODRÍGUES-LÁZARO, D.; LOMBARD, B.; SMITH, H.; RZEZUTKA, A.; D'AGOSTINO, M.; HELMUTH, R.; SCHROETER, A.; BURKHARD, M.; MIKO, A.; GUERRA, B.; DAVISON, J.; KOBILINSKY, A.; HERNÁNDEZ, M.; BERTHEAU, Y.; COOK, N. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 18, n. 6, p. 306-319, jun. 2007.

ROSMANITH, P.; KRASSNIG, M.; WAGNER, M.; HEIN, I. Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene. **Res. Microbiol.**, v. 157, n. 8, p. 763-771, out. 2006.

RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (eds). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Whashington, DC: American Public Health Association (APHA), 2001, p. 343-356.

SAGOO, S.K.; LITTLE, C.L.; MITCHELL, R.T. Microbiological quality of open read-to-eat salad vegetables: effectiveness of food hygiene training of management. **J. Food Prot.**, v.66, n.9, p.1581-1586, set. 2003a.

SAGOO, S.K.; LITTLE, C.L.; WARD, L.; GILLESPIE, I.A.; MITCHELL, R.T. Microbiological study of read-to-eat salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of salmonellosis. **J. Food Prot.**, v. 66, n. 3, p. 403-409, mar. 2003b.

SAKATE, R.I.; ARAGON, L.C.; RAGHIANTE, F.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Quantificação de *Listeria monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo. **Arch. Latinoamer. Nut.**, v. 53, n. 2, p. 184-187, jun. 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, W. D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3^a ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001.

SCHLECH III, W.F.; LAVIGNE, P.M.; BORTOLUSSI, R.A.; ALLEN, A.C.; HALDANE, E.V.; WORT, A.J.; HIGHTOWER, A.W.; JONHSON, S.E.; KING, S.H.; NICHOLLS, E.S.; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis - evidence for transmission by foods. **N. Engl. J. Med.**, v. 308, n. 4, p. 203-206, jan.1983.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos, 1999-2004. **Bol. Eletr. Epid.**, ano 5, n. 6, dez. 2005. Disponível em: www.saude.gov.br/svs. Acessado em 12 jun. 2008.

SEELIGER, H.P.R.; JONES, D. Genus *Listeria* pirie 1940^{383AL}. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. (eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 7ed. Baltimore, MD.: Williams & Wilkins Co., 1989. p. 1235-1245.

SILBERNAGEL, K.M.; CARVER, C.N.; JECHOREK, R.P.; JOHNSON, R.L. Evaluation of VIDAS *Listeria monocytogenes* II (LMO2) Immunoassay Method for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods: Collaborative Study. **J. AOAC Int.**, v. 87, n. 5, p. 1123-1132, 2004.

SILVA, E.O.; PUSCHMAN, R.; SOARES, N.F.F.; CARNELOSSI, M.A.G.; MORETTI, C.L.; CENCI, S.A. Processamento mínimo de hortaliças no Brasil. In: Simposium "Estado actual del mercado de frutos y vegetables cortados em Iberoamérica. San José, Costa Rica. **Impresso**, p. 87-98, 2004.

SMITH, D.; MAXWELL, P.W. Use of quantitative PCR to evaluate several methods for extracting DNA from corn flour and cornstarch. **Food Control**, v. 18, n. 3, p. 236-242, mar. 2007.

SNAPIR, Y.M.; VAISBEIN, E.; NASSAR, F. Low virulence but potentially fatal outcome – *Listeria ivanovii*. **Eur. J. Inter. Méd.**, v.17, n. 4, p. 286-287, jul. 2006.

SOARES, N.F.F.; GERALDINE, R.M. Aspectos Gerais da Tecnologia de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças: Embalagens. In: MORETTI, C.L. (ed). **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças** Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2007, p. 153-172.

SOMMER, L.; KASHI, Y. A PCR method based on 16S rRNA sequence for simultaneous detection of the genus *Listeria* sp. and the species *Listeria monocytogenes* in food products. **J. Food Prot.**, v. 66, n. 9, p. 1658–1665, set. 2003.

SOUZA, V.M.; FRANCESCHINI, S.A.; MARTINEZ, R.C.R.; RATTI, R.P.; DE MARTINIS, E.C.P. Survey of *Listeria* spp. in matched clinical, food and refrigerator samples at home level in Brazil. **Food Control**, v. 19, n. 10, p. 1011-1913, out. 2008.

SZABO, E.A.; SCURRAH, K.J., BURROWS, J.M. Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 30, n.6, p. 456-460, jun. 2000.

SPERBER, W.H. Hazard identification from a quantitative to a qualitative approach. **Food Control**, v. 12, n. 4, p. 223-228, jun. 2001.

SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. (eds). **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. 2 ed. Washington: ASM Press, 2001. p. 383-409.

SWAMINATHAN, B. The development of new diagnostic tools for food safety applications. In: STORRS, M.; DEVOLUY, M-C.; CRUVEILLER, P. (eds). **Food Safety Handbook: Microbiological Challenges**. França. bioMérieux Education, 2007a, p. 228-239.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microb. Infect.**, v. 9, n. 10, p. 1236-1243, ago. 2007b.

SWANSON, K.M.J.; PETRAN, R.L.; HANLIN, J.H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (eds). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association (APHA), 2001, p. 53-62.

THIMOTHE, J.; NIGHTINGALE, K.K.; GALL, K.; SCOTT, V.N.; WIEDMANN, M. Tracking of *Listeria monocytogenes* in smoked fish processing plants. **J. Food Prot.**, v. 67, n. 2, p. 328-341, fev. 2004.

VANETTI, M.C.D. Aspectos Gerais da Tecnologia de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças: Microbiologia. In: MORETTI, C.L. (ed). **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças** Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2007, p. 141-152.

VILELA, N.J.; HENZ, G.P. Situação atual da participação das hortaliças no agronegócio brasileiro e perspectivas futuras. **Cad. Cien. Tecnol.**, v. 17, n. 1, p. 71-89, jan./abr. 2000.

WANG, R-F.; CAO, W-W.; JOHNSON, M.G. 16S rRNA - based probes and Polymerase Chain Reaction Method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, n. 9, p. 2827-2831, set. 1992.

WHO and FAO - World Health Organization and Food and Agriculture Organization: Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods, MRA Series No. 4-5. Rome, Italy: Publishing Management Service, Information Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2004. Disponível em <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra_listeria/en/index.html>. Acessado em: 16 out. 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabela dos resultados das análises microbiológicas de amostras de hortaliças minimamente processadas

Tabela 8 – Avaliação microbiológica das 162 amostras de hortaliças minimamente processadas adquiridas em supermercados da cidade de Ribeirão Preto, SP, no período de setembro de 2007 a agosto de 2008.

Amostra	Hortaliça	Determinações					
		<i>Listeria</i> sp.	<i>Salmonella</i> sp.	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes	<i>E. coli</i>	Psicrotró- ficas aeróbias
		(em 25g)	(em 25g)	(NMP/g)	(NMP/g)	(NMP/g)	(Log UFC/g)
1	Repolho	Ausência	Ausência	$2,4 \times 10^2$	< 0,3	< 0,3	8,7
2	Couve	Ausência	Ausência	$1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	< 0,3	5,3
3	Couve	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$> 1,1 \times 10^6$	< 0,3	6,5
4	Alface	Ausência	Ausência	< 0,3	< 0,3	< 0,3	8,4
5	americana	Ausência	Ausência	$2,4 \times 10^2$	< 0,3	< 0,3	5,0
6	Repolho	Ausência	Ausência	$4,6 \times 10^4$	< 0,3	< 0,3	9,3
7	Repolho	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	< 0,3	< 0,3	6,7
8	Couve	Ausência	Ausência	< 0,3	< 0,3	< 0,3	7,6
9	Alface	Ausência	Ausência	< 0,3	< 0,3	< 0,3	7,6
10	americana	Ausência	Ausência	< 0,3	< 0,3	< 0,3	7,6
11	Couve	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	24	0,91	7,3
12	Couve	Ausência	Ausência	$4,6 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	< 0,3	5,0
13	Couve	Ausência	Ausência	$1,1 \times 10^5$	4,3	< 0,3	6,7
14	Repolho	Ausência	Ausência	$2,9 \times 10^5$	< 0,3	< 0,3	5,0
15	Couve	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$4,6 \times 10^3$	$4,6 \times 10^3$	7,6
16	Couve	Ausência	Ausência	$2,4 \times 10^5$	$4,6 \times 10^3$	$4,6 \times 10^3$	9,6
17	Alface	Ausência	Ausência	0,36	< 0,3	< 0,3	7,2
18	mimosa	Ausência	Ausência	< 0,3	< 0,3	< 0,3	5,7
19	Alface	Ausência	Ausência	< 0,3	< 0,3	< 0,3	5,7
20	americana	Ausência	Ausência	$2,4 \times 10$	< 0,3	< 0,3	5,0
21	Couve	Ausência	Ausência	$1,1 \times 10^6$	4,3	4,3	7,4
22	Couve	Ausência	Ausência	$4,6 \times 10^3$	< 0,3	< 0,3	7,2
23	Repolho	Ausência	Ausência	$1,1 \times 10^6$	< 0,3	< 0,3	7,7
24	Repolho	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$> 1,1 \times 10^6$	$1,9 \times 10^2$	9,3
25	Couve	Presença	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	< 0,3	< 0,3	7,7
26	Cheiro-verde	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	1,5	1,5	8,1
27	Cheiro-verde	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$2,4 \times 10^3$	$5,3 \times 10$	10,2
28	Alface	Presença	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	< 0,3	< 0,3	10,2
29	americana	Ausência	Ausência	< 0,3	< 0,3	< 0,3	10,2
30	Espinafre	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	4,3	1,5	10,7
31	Espinafre	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	< 0,3	< 0,3	8,7
32	Almeirão	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	< 0,3	< 0,3	10,1
33	Repolho	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	< 0,3	< 0,3	10,1
34	Cheiro-verde	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	4,3	4,3	9,4
35	Cheiro-verde	Ausência	Ausência	$1,5 \times 10^4$	2,3	2,3	10,7
36	Espinafre	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$4,6 \times 10$	< 0,3	7,8
37	Repolho	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	8,6
38	Cheiro-verde	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	8,6
39	Chicória	Ausência	Ausência	$2,4 \times 10^4$	< 0,3	< 0,3	8,5
40	Chicória	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	< 0,3	< 0,3	6,9
41	Acelga	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^3$	36×10^2	9,8
42	Couve	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^3$	36×10^2	9,8

Continua ...

...Continuação

Amostra	Hortaliça	Determinações					
		<i>Listeria</i> sp. (em 25g)	<i>Salmonella</i> sp. (em 25g)	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)	Psicrotróficas aeróbias (Log UFC/g)
35	Repolho	Ausência	Ausência	$3,9 \times 10^4$	< 0,3	< 0,3	8,5
36	Repolho	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$9,1 \times 10^4$	$2,4 \times 10^3$	9,4
37	Acelga	Ausência	Ausência	$1,5 \times 10^5$	$2,4 \times 10^2$	< 0,3	8,3
38	Rúcula	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$7,2 \times 10^3$	0,91	8,8
39	Couve	Ausência	Ausência	75×10^4	$4,6 \times 10^2$	$4,6 \times 10^2$	7,9
40	Alface americana	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	< 0,3	< 0,3	7,5
41	Alface (mista)	Ausência	Ausência	$2,1 \times 10$	< 0,3	< 0,3	6,8
42	Rúcula	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	0,91	< 0,3	8,8
43	Chicória	Ausência	Ausência	$4,6 \times 10^5$	15×10^4	1,5	8,8
44	Cheiro-verde	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$	$2,4 \times 10^3$	8,6
45	Almeirão	Ausência	Presença	$> 1,1 \times 10^6$	$4,6 \times 10^3$	0,36	8,5
46	Cheiro-verde	Ausência	Ausência	$1,1 \times 10^6$	$2,4 \times 10^2$	0,36	9,1
47	Almeirão	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$4,6 \times 10^4$	$5,3 \times 10^2$	8,9
48	Alface crespa	Ausência	Ausência	$9,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$	$2,4 \times 10^2$	7,3
49	Almeirão	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$2,4 \times 10^3$	< 0,3	9,6
50	Repolho	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	< 0,3	< 0,3	8,5
51	Acelga	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^3$	< 0,3	9,1
52	Couve	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$2,4 \times 10^4$	$2,4 \times 10$	7,0
53	Chicória	Ausência	Ausência	$1,1 \times 10^6$	$4,3 \times 10^3$	0,73	6,7
54	Cheiro-verde	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$> 1,1 \times 10^6$	$1,9 \times 10$	8,3
55	Couve	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	8,7
56	Cheiro-verde	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^4$	$3,6 \times 10$	9,2
57	Repolho	Ausência	Ausência	$1,1 \times 10^6$	$2,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$	9,5
58	Repolho roxo	Ausência	Ausência	$1,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$	7,3
59	Acelga	Ausência	Ausência	$4,6 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$	< 0,3	7,4
60	Chicória	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$> 1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^4$	9,4
61	Repolho	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$	$7,2 \times 10$	9,5
62	Alface americana	Ausência	Ausência	$4,6 \times 10^5$	0,36	0,36	8,8
63	Repolho roxo	Ausência	Ausência	$1,5 \times 10$	< 0,3	< 0,3	5,8
64	Repolho	Ausência	Ausência	$1,5 \times 10^5$	< 0,3	< 0,3	6,8
65	Alface crespa	Ausência	Ausência	$4,6 \times 10^2$	9,3	9,3	5,5
66	Couve	Ausência	Ausência	$4,6 \times 10^5$	7,5	4,3	7,2
67	Cheiro-verde	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	8,9
68	Cheiro-verde	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$2,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^2$	10,6

Continua...

...Continuação

Amostra	Hortalça	Determinações					
		<i>Listeria</i> sp. (em 25g)	<i>Salmonella</i> sp. (em 25g)	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)	Psicrotróficas aeróbias (Log UFC/g)
69	Cheiro-verde	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	9,5
70	Couve	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$2,1 \times 10$	8,1
71	Alface	Ausência	Ausência	$2,1 \times 10^2$	2	$< 0,3$	5,3
72	mimosa	Ausência	Ausência	$1,5 \times 10^3$	4,3	0,93	9,0
73	Rúcula	Ausência	Ausência	$9,3 \times 10^3$	2,3	2,3	7,8
74	Agrião	Ausência	Ausência	$1,5 \times 10$	$< 0,3$	$< 0,3$	6,3
75	Alface	Ausência	Ausência	$4,6 \times 10^4$	$< 0,3$	$< 0,3$	7,7
76	mimosa	Ausência	Ausência	$7,5 \times 10$	0,91	0,91	6,6
77	Alface	Ausência	Ausência	$2,1 \times 10^4$	$9,3 \times 10$	$< 0,3$	8,5
78	americana	Ausência	Ausência	$2,4 \times 10^3$	$< 0,3$	$< 0,3$	7,7
79	Acelga	Ausência	Ausência	$2,4 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$	$< 0,3$	8,1
80	Repolho	Ausência	Ausência	$7,5 \times 10^3$	$4,3 \times 10^2$	$< 0,3$	8,7
81	Repolho	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	2,3	$< 0,3$	9,5
82	Alface	Ausência	Ausência	$4,6 \times 10$	$< 0,3$	$< 0,3$	6,6
83	americana	Ausência	Ausência	$2,4 \times 10^4$	$< 0,3$	$< 0,3$	7,5
84	Acelga	Ausência	Ausência	$1,1 \times 10^4$	$< 0,3$	$< 0,3$	7,6
85	Repolho	Ausência	Ausência	$2,4 \times 10^2$	$< 0,3$	$< 0,3$	7,9
86	Alface	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	9,8
87	(mista)	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$3,9 \times 10^4$	$4,3 \times 10$	8,8
88	Couve	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$	$9,3 \times 10$	8,9
89	Repolho	Ausência	Ausência	$3,9 \times 10^4$	$9,3 \times 10$	0,62	8,7
90	Cheiro-verde	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	8,8
91	Cheiro-verde	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^2$	$3,6 \times 10$	9,0
92	Acelga	Ausência	Ausência	$1,1 \times 10^6$	$2,4 \times 10^5$	0,91	7,8
93	Cheiro-verde	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$	8,7
94	Couve	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$4,3 \times 10^3$	$1,4 \times 10^2$	8,2
95	Almeirão	Ausência	Presença	$> 1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$2,0 \times 10^2$	8,3
96	Cheiro-verde	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$4,6 \times 10$	$4,6 \times 10$	9,7
97	Almeirão	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$4,6 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	8,2
98	Couve	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$2,4 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	8,1
99	Cheiro-verde	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	8,5
100	Chicória	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	3,6	7,8
101	Espinafre	Ausência	Ausência	$1,1 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	0,36	8,0
102	Agrião	Ausência	Ausência	$4,6 \times 10^4$	4,3	$< 0,3$	7,8

Continua...

...Continuação

Amostra	Hortaliça	Determinações					
		<i>Listeria</i> sp. (em 25g)	<i>Salmonella</i> sp. (em 25g)	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)	Psicrotróficas aeróbias (Log UFC/g)
103	Alface crespa	Ausência	Ausência	2,4 x 10	0,91	0,91	7,8
104	Repolho	Ausência	Ausência	4,6 x 10 ⁵	9,3 x 10	< 0,3	9,4
105	Repolho	Ausência	Ausência	7,5 x 10 ⁴	2,0 x 10 ³	< 0,3	8,1
106	Repolho	Ausência	Ausência	4,6 x 10 ⁵	2,1 x 10 ³	9,1	9,2
107	Acelga	Ausência	Ausência	4,6 x 10 ⁴	1,5 x 10 ³	< 0,3	7,9
108	Chicória	Ausência	Ausência	4,6 x 10 ³	4,6 x 10 ³	< 0,3	6,8
109	Repolho roxo	Ausência	Ausência	1,1 x 10 ⁵	4,6 x 10 ²	< 0,3	8,9
110	Almeirão	Ausência	Ausência	> 1,1 x 10 ⁶	9,3 x 10	< 0,3	9,6
111	Repolho	Ausência	Ausência	> 1,1 x 10 ⁶	1,2 x 10 ³	0,91	9,5
112	Chicória	Ausência	Ausência	2,4 x 10 ²	< 0,3	< 0,3	5,0
113	Acelga	Ausência	Ausência	4,6 x 10 ³	0,3	< 0,3	6,3
114	Almeirão	Ausência	Ausência	1,1 x 10 ⁴	9,3 x 10	< 0,3	6,2
115	Alface (mista)	Ausência	Ausência	1,5 x 10 ³	< 0,3	< 0,3	7,8
116	Alface crespa	Ausência	Ausência	2,4 x 10 ³	2,3	< 0,3	6,7
117	Couve Cheiro- verde	Ausência	Ausência	> 1,1 x 10 ⁶ > 1,1 x 10 ⁶	1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	10,3
118	Acelga	Ausência	Ausência	> 1,1 x 10 ⁶	1,1 x 10 ³	4,6 x 10	10,5
119	Almeirão	Ausência	Ausência	> 1,1 x 10 ⁶	9,5 x 10	0,72	10,5
120	Chicória	Ausência	Ausência	4,6 x 10 ⁵	1,5 x 10 ³	9,3	8,5
121	Couve	Ausência	Ausência	2,4 x 10 ⁵	6,4	1,4	7,5
122	Couve Cheiro- verde	Ausência	Ausência	2,1 x 10 ² > 1,1 x 10 ⁶	9,3 x 10	2,1 x 10	7,9
123	Almeirão	Ausência	Ausência	> 1,1 x 10 ⁶	1,5 x 10 ²	7,5 x 10	9,7
124	Rúcula	Ausência	Ausência	> 1,1 x 10 ⁶	2,4 x 10	2,1	8,8
125	Alface lisa	Ausência	Ausência	1,1 x 10 ⁵	4,3	4,3	8,5
126	Espinafre	Ausência	Ausência	2,4 x 10	< 0,3	< 0,3	6,5
127	Couve	Ausência	Ausência	2,4 x 10 ³	< 0,3	< 0,3	7,4
128	Alface (mista)	Ausência	Ausência	> 1,1 x 10 ⁶	4,3 x 10 ³	0,91	9,8
129	Repolho	Ausência	Ausência	1,1 x 10 ⁵	0,36	< 0,3	8,4
130	Acelga	Ausência	Ausência	> 1,1 x 10 ⁶	< 0,3	< 0,3	7,9
131	Couve	Ausência	Ausência	2,8 x 10 ³	< 0,3	< 0,3	7,8
132	Espinafre	Ausência	Ausência	> 1,1 x 10 ⁶	2,7 x 10	9,3	6,7
133	Couve Cheiro- verde	Presença	Ausência	1100000 > 1,1 x 10 ⁶	1,5 x 10 ³	4,4 x 10	7,9
134	Chicória	Ausência	Ausência	> 1,1 x 10 ⁶	1,9 x 10 ³	4,6 x 10	9,5
135	Espinafre	Ausência	Ausência	> 1,1 x 10 ⁶	1,9 x 10 ³	1,9 x 10 ³	11,2
136	Espinafre	Ausência	Ausência	2,9	< 0,3	< 0,3	11,2
137	Espinafre	Ausência	Ausência	2,0 x 10 ⁴	1,5	1,5	7,3

Continua...

...Continuação

Amostra	Hortaliça	Determinações					
		<i>Listeria</i> sp. (em 25g)	<i>Salmonella</i> sp. (em 25g)	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)	Psicrotróficas aeróbias (Log UFC/g)
138	Chicória	Ausência	Ausência	$2,4 \times 10^3$	< 0,3	< 0,3	8,2
139	Chicória	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10$	$9,3 \times 10$	9,8
140	Cheiro-verde	Presença	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	2,8	< 0,3	9,7
141	Acelga	Presença	Ausência	9,3	< 0,3	< 0,3	7,0
142	Alface						
142	crespa	Ausência	Ausência	< 0,3	< 0,3	< 0,3	5,8
143	Alface lisa	Ausência	Ausência	0,36	< 0,3	< 0,3	5,3
144	Repolho	Ausência	Ausência	$1,0 \times 10^2$	< 0,3	< 0,3	8,3
144	Repolho						
145	roxo	Ausência	Ausência	$2,0 \times 10$	< 0,3	< 0,3	7,9
146	Agrião	Ausência	Ausência	$1,0 \times 10^3$	< 0,3	< 0,3	7,6
147	Rúcula	Ausência	Ausência	$2,4 \times 10^3$	< 0,3	< 0,3	10,6
148	Couve	Ausência	Ausência	$2,4 \times 10^3$	< 0,3	< 0,3	6,6
148	Alface						
149	americana	Ausência	Ausência	$1,5 \times 10^3$	< 0,3	< 0,3	6,8
149	Alface						
150	crespa	Ausência	Ausência	$4,6 \times 10$	< 0,3	< 0,3	7,0
151	Agrião	Ausência	Ausência	0,91	< 0,3	< 0,3	5,0
151	Alface						
152	americana	Ausência	Ausência	$2,4 \times 10^2$	< 0,3	< 0,3	7,2
153	Acelga	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	< 0,3	< 0,3	8,9
154	Rúcula	Ausência	Ausência	$1,1 \times 10^4$	< 0,3	< 0,3	10,4
155	Espinafre	Ausência	Ausência	$1,1 \times 10^6$	< 0,3	< 0,3	9,6
155	Cheiro-verde			$> 1,1 \times 10^6$			
156	Cheiro-verde	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	$4,6 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	9,7
157	Cheiro-verde	Ausência	Ausência		$7,5 \times 10^2$	$7,5 \times 10^2$	10,4
158	Couve	Presença	Ausência	$2,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^4$	$7,5 \times 10^2$	9,4
159	Espinafre	Ausência	Ausência	$1,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	8,6
160	Almeirão	Ausência	Ausência	$1,1 \times 10^4$	< 0,3	< 0,3	7,5
161	Couve	Ausência	Ausência	$> 1,1 \times 10^6$	< 0,3	< 0,3	8,6
162	Couve	Ausência	Ausência	$2,4 \times 10^4$	0,36	< 0,3	7,7

*. contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* abaixo do limite de quantificação do método (< 0,3 NMP/g)

APÊNDICE B – Tabelas de NMP do método convencional e PCR em tempo real aplicados na quantificação de *L. monocytogenes* em hortaliças minimamente processadas.

Tabela 9 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de couve refrigerada (H 21) e naturalmente contaminada.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 21.1	10	+	1	+	3
H 21.2		-		+	
H 21.3		-		+	
H 21.4		+		+	
H 21.5	1	-	1	+	3
H 21.6		-		+	
H 21.7		+		+	
H 21.8		+		+	
H 21.9	0,1	+	3	+	3
H 21.10		+		+	
H 21.11		-		-	
H 21.12		-		-	
H 21.13	0,01	-	1	-	1
H 21.14		+		+	
H 21.15		-		-	
H 21.16		-		-	
H 21.17	0,0001	-	0	-	0
H 21.18		-		-	
H 21.19		-		-	
H 21.20		-		-	
H 21.21	0,00001	-	0	-	0
H 21.22		-		-	
H 21.23		-		-	
H 21.24		-		-	

* NMP = 4,6/g do alimento; ** NMP = $1,1 \times 10^2$ /g do alimento

Tabela 10 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de couve congelada (H 21c) e naturalmente contaminada.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 21c.1	10	-	0	+	3
H 21c.2		-		+	
H 21c.3		-		+	
H 21c.4		-		+	
H 21c.5	1	+	1	+	3
H 21c.6		-		+	
H 21c.7		-		+	
H 21c.8		-		+	
H 21c.9	0,1	+	1	+	3
H 21c.10		+		+	
H 21c.11		+		+	
H 21c.12		+		+	
H 21c.13	0,001	+	3	-	2
H 21c.14		+		+	
H 21c.15		+		+	
H 21c.16		+		+	
H 21c.17	0,0001	-	1	-	1
H 21c.18		-		-	
H 21c.19		+		-	
H 21c.20		-		-	
H 21c.21	0,00001	+	2	-	0
H 21c.22		-		-	
H 21c.23		-		-	
H 21c.24		-		-	

* NMP = $1,1 \times 10^2$ /g do alimento; ** NMP = $1,5 \times 10^3$ /g do alimento

Tabela 11 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de cheiro-verde refrigerada (H 23) e naturalmente contaminada.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 23.1	10	+	3	+	3
H 23.2		+		+	
H 23.3		+		+	
H 23.4		+		+	
H 23.5	1	+	2	+	3
H 23.6		-		+	
H 23.7	0,1	+	3	+	3
H 23.8		+		+	
H 23.9		+		+	
H 23.10	0,01	+	2	+	3
H 23.11		+		+	
H 23.12	0,001	-	3	+	3
H 23.13		+		+	
H 23.14		+		+	
H 23.15		+		+	
H 23.16	0,0001	+	3	+	3
H 23.17		+		+	
H 23.18		+		+	
H 23.19	0,00001	+	3	+	3
H 23.20		+		+	
H 23.21		+		+	
H 23.22	0,000001	+	3	+	3
H 23.23		+		+	
H 23.24		+		+	

* NMP = $4,6 \times 10^5$ /g do alimento; ** NMP = $\geq 2,4 \times 10^6$ /g do alimentoTabela 12 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de cheiro-verde congelada (H 23c) e naturalmente contaminada.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 23c.1	10	-	1	+	3
H 23c.2		-		+	
H 23c.3		+		+	
H 23c.4		-		-	
H 23c.5	1	-	0	+	1
H 23c.6		-		-	
H 23c.7	0,1	-	0	-	0
H 23c.8		-		-	
H 23c.9		-		-	
H 23c.10	0,01	-	0	-	0
H 23c.11		-		-	
H 23c.12	0,001	-	0	-	0
H 23c.13		-		-	
H 23c.14		-		-	
H 23c.15		-		-	
H 23c.16	0,0001	-	0	-	0
H 23c.17		-		-	
H 23c.18		-		-	
H 23c.19	0,00001	-	0	-	0
H 23c.20		-		-	
H 23c.21		-		-	
H 23c.22	0,000001	-	0	-	0
H 23c.23		-		-	
H 23c.24		-		-	

* NMP = 0,04/g do alimento; ** NMP = 0,43/g do alimento

Tabela 13 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de alface (H 152) sem inoculação.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 152.1	10	-	0	-	0
H 152.2		-		-	
H 152.3		-		-	
H 152.4		-	0	-	0
H 152.5	1	-		-	
H 152.6		-		-	
H 152.7		-	0	-	0
H 152.8		-		-	
H 152.9	0,1	-		-	
H 152.10		-		-	
H 152.11		-	0	-	0
H 152.12		-		-	
H 152.13	0,001	-		-	
H 152.14		-	0	-	0
H 152.15		-		-	
H 152.16		-		-	
H 152.17	0,0001	-	0	-	0
H 152.18		-		-	
H 152.19		-		-	
H 152.20		-	0	-	0
H 152.21	0,00001	-		-	
H 152.22		-		-	
H 152.23		-	0	-	0
H 152.24		-		-	

* NMP < 0,03/g do alimento; ** NMP < 0,03/g do alimento

Tabela 14 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de alface (H 152) artificialmente contaminada, com nível de inoculação 10 UFC/g do alimento.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 152.1	10	+		+	
H 152.2		+	3	+	3
H 152.3		+		+	
H 152.4		+		+	
H 152.5	1	+	3	+	3
H 152.6		+		+	
H 152.7		-		+	
H 152.8		+	2	+	3
H 152.9	0,1	+		+	
H 152.10		-		-	
H 152.11		-	0	-	0
H 152.12		-		-	
H 152.13	0,001	-		-	
H 152.14		-	0	-	1
H 152.15		-		+	
H 152.16		-		-	
H 152.17	0,0001	-	0	-	0
H 152.18		-		-	
H 152.19		-		-	
H 152.20		-	0	-	0
H 152.21	0,00001	-		-	
H 152.22		-		-	
H 152.23		-	1	-	0
H 152.24		+		-	

* NMP = 2,4 x 10/g do alimento; ** NMP = 3,9 x 10/g do alimento

Tabela 15 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de alface (H 152) artificialmente contaminada, com nível de inoculação 70 UFC/g do alimento.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 152.1	10	+	3	+	3
H 152.2		+		+	
H 152.3		+		+	
H 152.4		+		+	
H 152.5	1	+	3	+	3
H 152.6		+		+	
H 152.7		+		+	
H 152.8		+		+	
H 152.9	0,1	+	3	+	3
H 152.10		+		+	
H 152.11		+		+	
H 152.12		+		+	
H 152.13	0,01	+	3	-	3
H 152.14		+		-	
H 152.15		+		-	
H 152.16		+		-	
H 152.17	0,001	+	0	+	0
H 152.18		+		+	
H 152.19		+		+	
H 152.20		+		+	
H 152.21	0,0001	+	2	+	2
H 152.22		+		+	
H 152.23		+		+	
H 152.24		+		+	

* NMP = $6,4 \times 10^2$ /g do alimento; ** NMP = $6,4 \times 10^2$ /g do alimento

Tabela 16 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de alface (H 152) artificialmente contaminada, com nível de inoculação 424 UFC/g do alimento.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 152.1	10	+	3	+	3
H 152.2		+		+	
H 152.3		+		+	
H 152.4		+		+	
H 152.5	1	+	3	+	3
H 152.6		+		+	
H 152.7		+		+	
H 152.8		+		+	
H 152.9	0,1	+	3	+	3
H 152.10		+		+	
H 152.11		+		+	
H 152.12		+		+	
H 152.13	0,01	+	2	+	3
H 152.14		+		+	
H 152.15		+		+	
H 152.16		+		+	
H 152.17	0,001	+	1	+	3
H 152.18		+		+	
H 152.19		+		+	
H 152.20		+		+	
H 152.21	0,0001	+	1	+	1
H 152.22		+		+	
H 152.23		+		+	
H 152.24		+		+	

* NMP = $4,3 \times 10^2$ /g do alimento; ** NMP = $4,3 \times 10^3$ /g do alimento

Tabela 17 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de cheiro-verde (H 156) sem inoculação.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 156.1	10	-	0	-	0
H 156.2		-		-	
H 156.3		-		-	
H 156.4		-	0	-	0
H 156.5	1	-		-	
H 156.6		-		-	
H 156.7		-	0	-	0
H 156.8		-		-	
H 156.9	0,1	-		-	
H 156.10		-		-	
H 156.11		-	0	-	0
H 156.12		-		-	
H 156.13	0,001	-		-	
H 156.14		-	0	-	0
H 156.15		-		-	
H 156.16		-		-	
H 156.17	0,0001	-	0	-	0
H 156.18		-		-	
H 156.19		-		-	
H 156.20		-	0	-	0
H 156.21	0,00001	-		-	
H 156.22		-		-	
H 156.23		-	0	-	0
H 156.24		-		-	

* NMP < 0,03/g do alimento; ** NMP < 0,03/g do alimento

Tabela 18 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de cheiro-verde (H 156) artificialmente contaminada, com nível de inoculação 12 UFC/g do alimento.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 156.1	10	+	3	+	3
H 156.2		+		+	
H 156.3		+		+	
H 156.4		-	0	+	3
H 156.5	1	-		+	
H 156.6		-		+	
H 156.7		-	2	+	3
H 156.8		+		+	
H 156.9	0,1	+		+	
H 156.10		+		+	
H 156.11		-	1	-	1
H 156.12		-		-	
H 156.13	0,001	-		-	
H 156.14		-	0	-	0
H 156.15		-		-	
H 156.16		-		-	
H 156.17	0,0001	-	0	-	0
H 156.18		-		-	
H 156.19		-		-	
H 156.20		-	0	-	0
H 156.21	0,00001	-		-	
H 156.22		-		-	
H 156.23		-	0	-	0
H 156.24		-		-	

* NMP= 2,4/g do alimento; ** NMP= 4,3 x 10/g do alimento

Tabela 19 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de cheiro-verde (H 156) artificialmente contaminada, com nível de inoculação 116 UFC/g do alimento.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 156.1	10	+	1	+	3
H 156.2		-		+	
H 156.3		-		+	
H 156.4	1	-	0	+	3
H 156.5		-		+	
H 156.6		-		+	
H 156.7	0,1	+	3	+	3
H 156.8		+		+	
H 156.9		+		+	
H 156.10	0,01	+	2	+	3
H 156.11		+		+	
H 156.12		-		+	
H 156.13	0,001	+	1	+	1
H 156.14		-		-	
H 156.15		-		-	
H 156.16	0,0001	-	0	-	0
H 156.17		-		-	
H 156.18		-		-	
H 156.19	0,00001	-	0	-	0
H 156.20		-		-	
H 156.21		-		-	
H 156.22	0,000001	-	0	-	0
H 156.23		-		-	
H 156.24		-		-	

* NMP= 4,3/g do alimento; ** NMP= 4,3 x 10²/g do alimento

Tabela 20 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de cheiro-verde (H 156) artificialmente contaminada, com nível de inoculação 1040 UFC/g do alimento.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 156.1	10	+	3	+	3
H 156.2		+		+	
H 156.3		+		+	
H 156.4	1	+	3	+	3
H 156.5		+		+	
H 156.6		+		+	
H 156.7	0,1	+	3	+	3
H 156.8		+		+	
H 156.9		+		+	
H 156.10	0,01	+	3	+	3
H 156.11		+		+	
H 156.12		+		+	
H 156.13	0,001	+	3	+	3
H 156.14		+		+	
H 156.15		+		+	
H 156.16	0,0001	+	2	+	2
H 156.17		+		+	
H 156.18		-		-	
H 156.19	0,00001	-	0	-	0
H 156.20		-		-	
H 156.21		-		-	
H 156.22	0,000001	+	2	-	0
H 156.23		+		-	
H 156.24		-		-	

* NMP= 9,3 x 10³/g do alimento; ** NMP= 9,3 x 10³/g do alimento

Tabela 21 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de repolho (H 144) artificialmente contaminada, com nível de inoculação 10 UFC/g do alimento.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 144.1	10	+	3	+	3
H 144.2		+		+	
H 144.3		+		+	
H 144.4	1	+	3	+	3
H 144.5		+		+	
H 144.6		+		+	
H 144.7	0,1	+	3	+	3
H 144.8		+		+	
H 144.9		+		+	
H 144.10	0,01	+	2	+	2
H 144.11		+		+	
H 144.12		-		-	
H 144.13	0,001	-	0	-	0
H 144.14		-		-	
H 144.15		-		-	
H 144.16	0,0001	-	0	-	0
H 144.17		-		-	
H 144.18		-		-	
H 144.19	0,00001	-	0	-	0
H 144.20		-		-	
H 144.21		-		-	
H 144.22	0,000001	-	0	-	0
H 144.23		-		-	
H 144.24		-		-	

* NMP= $9,3 \times 10^2$ /g do alimento; ** NMP= $9,3 \times 10^2$ /g do alimento

Tabela 22 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de repolho (H 144) artificialmente contaminada, com nível de inoculação 30 UFC/g do alimento.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 144.1	10	+	3	+	3
H 144.2		+		+	
H 144.3		+		+	
H 144.4	1	+	3	+	3
H 144.5		+		+	
H 144.6		+		+	
H 144.7	0,1	+	3	+	3
H 144.8		+		+	
H 144.9		+		+	
H 144.10	0,01	+	3	+	3
H 144.11		+		+	
H 144.12		+		+	
H 144.13	0,001	-	1	-	1
H 144.14		+		+	
H 144.15		-		-	
H 144.16	0,0001	-	0	-	0
H 144.17		-		-	
H 144.18		-		-	
H 144.19	0,00001	-	0	-	0
H 144.20		-		-	
H 144.21		-		-	
H 144.22	0,000001	-	0	-	0
H 144.23		-		-	
H 144.24		-		-	

* NMP= $4,3 \times 10^2$ /g do alimento; ** NMP= $4,3 \times 10^2$ /g do alimento

Tabela 23 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de repolho (H 144) artificialmente contaminada, com nível de inoculação 200 UFC/g do alimento.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 144.1	10	+	3	+	3
H 144.2		+		+	
H 144.3		+		+	
H 144.4	1	+	3	+	3
H 144.5		+		+	
H 144.6		+		+	
H 144.7	0,1	+	3	+	3
H 144.8		+		+	
H 144.9		+		+	
H 144.10	0,01	+	3	+	3
H 144.11		+		+	
H 144.12		+		+	
H 144.13	0,001	+	3	+	3
H 144.14		+		+	
H 144.15		+		+	
H 144.16	0,0001	-	1	-	1
H 144.17		-		-	
H 144.18		+		+	
H 144.19	0,00001	-	0	-	0
H 144.20		-		-	
H 144.21		-		-	
H 144.22	0,000001	-	0	-	0
H 144.23		-		-	
H 144.24		-		-	

* NMP= $4,3 \times 10^3$ /g do alimento; ** NMP= $4,3 \times 10^3$ /g do alimento

Tabela 24 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de acelga (H 141) artificialmente contaminada, com nível de inoculação 10 UFC/g do alimento.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 141.1	10	+	2	+	3
H 141.2		+		+	
H 141.3		-		+	
H 141.4	1	+	2	+	3
H 141.5		-		+	
H 141.6		+		+	
H 141.7	0,1	+	3	+	3
H 141.8		+		+	
H 141.9		-		+	
H 141.10	0,01	-	0	+	0
H 141.11		-		+	
H 141.12		-		-	
H 141.13	0,001	-	0	-	0
H 141.14		-		-	
H 141.15		-		-	
H 141.16	0,0001	-	0	-	0
H 141.17		-		-	
H 141.18		-		-	
H 141.19	0,00001	-	0	-	0
H 141.20		-		-	
H 141.21		-		-	
H 141.22	0,000001	-	0	-	0
H 141.23		-		-	
H 141.24		-		-	

* NMP= 2,4/g do alimento; ** NMP= $2,4 \times 10^3$ /g do alimento

Tabela 25 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de acelga (H 141) artificialmente contaminada, com nível de inoculação 80 UFC/g do alimento.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 141.1	10	+	3	+	3
H 141.2		+		+	
H 141.3		+		+	
H 141.4	1	+	3	+	3
H 141.5		+		+	
H 141.6		+		+	
H 141.7	0,1	+	3	+	3
H 141.8		+		+	
H 141.9		+		+	
H 141.10	0,01	-		-	
H 141.11		+	1	+	2
H 141.12		-		+	
H 141.13	0,001	-		-	
H 141.14		-	0	-	0
H 141.15		-		-	
H 141.16	0,0001	-		-	
H 141.17		-	1	-	0
H 141.18		+		-	
H 141.19	0,00001	+		-	
H 141.20		-	1	-	0
H 141.21		-		-	
H 141.22	0,000001	-		-	
H 141.23		-	0	-	0
H 141.24		-		-	

* NMP= $2,4 \times 10^2$ /g do alimento; ** NMP= $9,3 \times 10$ /g do alimento

Tabela 26 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de acelga (H 141) artificialmente, com nível de inoculação 700 UFC/g do alimento.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 141.1	10	+	3	+	3
H 141.2		+		+	
H 141.3		+		+	
H 141.4	1	+	3	+	3
H 141.5		+		+	
H 141.6		+		+	
H 141.7	0,1	+	3	+	3
H 141.8		+		+	
H 141.9		+		+	
H 141.10	0,01	+		+	
H 141.11		+	3	+	3
H 141.12		+		+	
H 141.13	0,001	+		+	
H 141.14		+	3	-	2
H 141.15		+		+	
H 141.16	0,0001	-		-	
H 141.17		-	1	-	0
H 141.18		+		-	
H 141.19	0,00001	-		-	
H 141.20		-	1	-	1
H 141.21		+		+	
H 141.22	0,000001	-		-	
H 141.23		-	0	-	0
H 141.24		-		-	

* NMP= $9,3 \times 10^3$ /g do alimento; ** NMP= $2,4 \times 10^3$ /g do alimento

Tabela 27 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de almeirão (H 160) artificialmente contaminada, com nível de inoculação 10 UFC/g do alimento.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 160.1	10	+	3	+	3
H 160.2		+		+	
H 160.3		+		+	
H 160.4	1	+	3	+	3
H 160.5		+		+	
H 160.6		+		+	
H 160.7	0,1	+	2	+	3
H 160.8		+		+	
H 160.9		-		+	
H 160.10	0,01	-		+	
H 160.11		-	0	-	1
H 160.12		-		-	
H 160.13	0,001	-		-	
H 160.14		-	0	-	0
H 160.15		-		-	
H 160.16	0,0001	-		-	
H 160.17		-	0	-	0
H 160.18		-		-	
H 160.19	0,00001	-		-	
H 160.20		-	0	-	0
H 160.21		-		-	
H 160.22	0,000001	-		-	
H 160.23		-	0	-	0
H 160.24		-		-	

* NMP= $1,1 \times 10^2$ /g do alimento; ** NMP= $4,3 \times 10^2$ /g do alimento

Tabela 28 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de almeirão (H 160) artificialmente contaminada, com nível de inoculação 70 UFC/g do alimento.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 160.1	10	+	3	+	3
H 160.2		+		+	
H 160.3		+		+	
H 160.4	1	+	3	+	3
H 160.5		+		+	
H 160.6		+		+	
H 160.7	0,1	+	3	+	3
H 160.8		+		+	
H 160.9		+		+	
H 160.10	0,01	+		+	
H 160.11		+	2	+	3
H 160.12		-		+	
H 160.13	0,001	-		+	
H 160.14		-	0	-	1
H 160.15		-		-	
H 160.16	0,0001	-		-	
H 160.17		-	0	-	0
H 160.18		-		-	
H 160.19	0,00001	-		-	
H 160.20		-	0	-	0
H 160.21		-		-	
H 160.22	0,000001	-		-	
H 160.23		-	0	-	0
H 160.24		-		-	

* NMP= $1,1 \times 10^2$ /g do alimento; ** NMP= $4,3 \times 10^2$ /g do alimento

Tabela 29 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de almeirão (H 160) artificialmente contaminada, com nível de inoculação 880/g do alimento.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 160.1	10	+	3	+	3
H 160.2		+		+	
H 160.3		+		+	
H 160.4	1	+	3	+	3
H 160.5		+		+	
H 160.6		+		+	
H 160.7	0,1	+	3	+	3
H 160.8		+		+	
H 160.9		+		+	
H 160.10	0,01	+		+	
H 160.11		+	3	+	3
H 160.12		+		+	
H 160.13	0,001	+		+	
H 160.14		+	2	-	1
H 160.15		-		-	
H 160.16	0,0001	-		-	
H 160.17		-	0	-	0
H 160.18		-		-	
H 160.19	0,00001	-		-	
H 160.20		-	0	-	0
H 160.21		-		-	
H 160.22	0,000001	-		-	
H 160.23		-	0	-	0
H 160.24		-		-	

* NMP= $4,3 \times 10^2$ /g do alimento; ** NMP= $9,3 \times 10^2$ /g do alimento

Tabela 30 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de couve (H 148) artificialmente contaminada, com nível de inoculação 10/g do alimento.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 148.1	10	+	3	+	3
H 148.2		+		+	
H 148.3		+		+	
H 148.4	1	+	3	+	3
H 148.5		+		+	
H 148.6		+		+	
H 148.7	0,1	+	3	+	3
H 148.8		+		+	
H 148.9		+		+	
H 148.10	0,01	-		-	
H 148.11		-	1	-	1
H 148.12		+		+	
H 148.13	0,001	-		-	
H 148.14		-	0	-	0
H 148.15		-		-	
H 148.16	0,0001	-		-	
H 148.17		-	0	-	0
H 148.18		-		-	
H 148.19	0,00001	-		-	
H 148.20		-	0	-	0
H 148.21		-		-	
H 148.22	0,000001	-		-	
H 148.23		-	0	-	0
H 148.24		-		-	

* NMP= $4,3 \times 10$ /g do alimento; ** NMP= $4,3 \times 10$ /g do alimento

Tabela 31 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de couve (H 148) artificialmente contaminada, com nível de inoculação 46/g do alimento.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 148.1	10	+	3	+	3
H 148.2		+		+	
H 148.3		+		+	
H 148.4	1	+	3	+	3
H 148.5		+		+	
H 148.6		+		+	
H 148.7	0,1	+	3	+	3
H 148.8		+		+	
H 148.9		+		+	
H 148.10	0,01	+		+	
H 148.11		+	3	+	3
H 148.12		+		+	
H 148.13	0,001	+		+	
H 148.14		-	1	-	1
H 148.15		-		-	
H 148.16		-		-	
H 148.17	0,0001	-	0	-	0
H 148.18		-		-	
H 148.19		-		-	
H 148.20	0,00001	-	0	-	0
H 148.21		-		-	
H 148.22		-		-	
H 148.23	0,000001	+	1	+	1
H 148.24		-		-	

* NMP= $9,3 \times 10^2$ /g do alimento; ** NMP= $9,3 \times 10^2$ /g do alimento

Tabela 32 – Resultados de NMP de *L. monocytogenes* para a amostra de couve (H 148) artificialmente contaminada, com nível de inoculação 800/g do alimento.

Hortaliça minimamente processada	Gramas do alimento	Método da PCR em tempo real*	Resultado	Método Convencional de cultivo**	Resultado
H 148.1	10	+	3	+	3
H 148.2		+		+	
H 148.3		+		+	
H 148.4	1	+	3	+	3
H 148.5		+		+	
H 148.6		+		+	
H 148.7	0,1	+	3	+	3
H 148.8		+		+	
H 148.9		+		+	
H 148.10	0,01	+		+	
H 148.11		+	3	+	3
H 148.12		+		+	
H 148.13	0,001	+		+	
H 148.14		+	3	+	3
H 148.15		+		+	
H 148.16	0,0001	+		-	
H 148.17		+	2	-	0
H 148.18		-		-	
H 148.19		-		-	
H 148.20	0,00001	-	0	-	0
H 148.21		-		-	
H 148.22		-		-	
H 148.23	0,000001	-	0	-	0
H 148.24		-		-	

* NMP= $2,4 \times 10^4$ /g do alimento; ** NMP= $2,4 \times 10^3$ /g do alimento