UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Emprego de um método molecular para avaliar a presença
de *Listeria monocytogenes* em saladas
de hortaliças folhosas minimamente
processadas

Hans Fröder

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Destro

São Paulo
2005

Hans Fröder

Emprego de um método molecular para avaliar a presença
de *Listeria monocytogenes* em saladas
de hortaliças folhosas minimamente
processadas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Destro
(Orientadora/Presidente)

(1º examinador)

(2º examinador)

São Paulo, janeiro de 2005.

**Tal ciência é para mim
maravilhosíssima; tão alta que
não a posso atingir.**

Salmos 139.6

Dedico

essa dissertação aos meus pais, Erico e Loni e a minha irmã Deisi, pela saudade,
preocupação e amor incondicional.

Obrigado por confiar em mim e acreditar
em meu potencial.

Longe ou perto, mas sempre
morando em meu coração.

Amo vocês!

Teresa

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”.

Charles Chaplin

Agradeço

A DEUS, pela vida e saúde que me tem concedido, diariamente!

Minha estima especial à professora Dra. Maria Teresa Destro, pelas orientações, ensinamentos, conselhos e por ouvir meus desabaços, pela amizade e paciência ao longo destes anos. Considero-a uma “mãe”. Sinceramente, muito obrigado!

Às professoras Dra. Bernadette D. G. M. Franco e Dra. Mariza Landgraf, pelos ensinamentos, orientações, convívio e amizade.

Ao Dr. Laercio Goularte, pelas valiosas sugestões e pela amizade.

À amiga, ex-professora e chefe Rosângela U. Salvatori (mãe Tuca), minha fonte inspiradora.

À Food Intelligence – Consultoria Técnica em Alimentos S/C, em especial à pessoa do Sr. Aldo Baccarin, pela disponibilização do kit e apoio na infra-estrutura laboratorial.

Aos funcionários da Food Intelligence: André, Adriana, Alex, Caio e Flávia (em especial), Débora, Efigênia, Inês, Lígia, Jorge, Manderlyn, Marilene, Paulinho e Paulo de Tarso. Valeu!

A Luciana Natal Waetge da DuPont, divisão Qualicon, pelo treinamento, disponibilização do kit e auxílio financeiro para a participação no Congresso Brasileiro de Microbiologia.

A Nara Zucato da Madasa do Brasil, pelo envio do material técnico-científico.

À 3M do Brasil, pela doação das placas PetrifilmTM.

Às funcionárias do Laboratório de Microbiologia, Lúcia e Kátia, pela amizade e auxílio.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos: Alcina, Antônio, Cecília (obrigado pela ajuda), Cíntia, Cristiano, Cristina, Eb, Gabriela, Gunnar, Janine, Lina (te admiro como pessoa), Luciano, Mônica, Patrícia Kary, Patrícia Bettini, Paulo (sempre disposto a ajudar), Ricardo, Tatiana, Vanessa Tsu, Vanessa Vieira, Vinícius e demais pela amizade, colaboração e troca de conhecimentos. Obrigado pela amizade!

Aos funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas.

Às secretárias do Departamento de Ciência dos Alimentos e Nutrição Experimental: Mônica e Tânia.

À secretaria de pós-graduação da FCF: Elaine e Jorge.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo fornecimento de bolsa de estudo.

E a todos que, direta ou indiretamente, cooperaram com este resumo de esforço.

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO.....	9
ÍNDICE DE ANEXOS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Métodos de detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	25
2. OBJETIVOS.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. Material.....	33
3.1.1. Preparo das amostras.....	34
3.2. Métodos.....	34
3.2.1. Pesquisa de <i>Listeria</i> sp. pelo método convencional.....	34
3.2.2. Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> empregando-se o BAX® System...	35
3.2.3. Avaliação da microbiota dos vegetais MP.....	35
3.2.3.1. Diluição das amostras.....	35
3.2.3.2. Enumeração de aeróbios psicrótróficos.....	36
3.2.3.3. Enumeração de coliformes totais e fecais.....	36

	Página
3.2.3.4. Enumeração de enterobactérias.....	36
3.2.3.5. Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1. Ocorrência de <i>Listeria</i> sp. em vegetais MP.....	40
4.2. Avaliação da microbiota dos vegetais MP.....	42
4.3. Avaliação do BAX [®] System para detecção de <i>L. monocytogenes</i> em vegetais MP.....	45
5. CONCLUSÕES.....	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
ANEXO 1. Resultados dos “racks report” do BAX [®] System para detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	74
ANEXO 2. Perfil da curva de fusão “melting curve” de <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> da amostra positiva (espinafre).....	91
ANEXO 3. Perfil da curva de fusão “melting curve” do controle interno.....	92
ANEXO 4. Formulação do meio de cultura empregado.....	93

RESUMO

A demanda por frutas e hortaliças frescas, associada à necessidade de maior praticidade da vida atual, está causando um aumento no interesse, por parte dos consumidores, nos produtos minimamente processados (MP). Processamento mínimo inclui as operações de lavagem, corte, descascamento e embalagem do produto. Entre os microrganismos patogênicos que, potencialmente, podem ser transmitidos por vegetais MP citam-se: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* sp. A pesquisa destes microrganismos é usualmente demorada mas, a cada dia, novos métodos para detecção rápida de patógenos em alimentos são lançados no mercado. Dentre estes métodos, aqueles que empregam ferramentas moleculares têm se tornado mais populares, cabendo destacar os que empregam a reação de polimerização em cadeia (PCR). Para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* existe no mercado o sistema automatizado BAX[®]System que permite a detecção de *L. monocytogenes* em, no máximo, 54 h. Neste estudo, buscou-se avaliar a microbiota de vegetais folhosos MP além do emprego do sistema BAX[®] para a detecção de *L. monocytogenes* nestes produtos. Foram examinadas, no período de março a julho de 2003, 181 amostras de saladas MP coletadas em diferentes estabelecimentos comerciais no município de São Paulo, SP. Em 133 amostras foram feitas determinações das populações de coliformes totais e fecais, *Enterobacteriaceae*, microrganismos psicrotróficos aeróbios e pesquisa de *Salmonella* sp. *L. monocytogenes* foi pesquisada nas 181 amostras empregando-se o sistema BAX[®] e, paralelamente, a semeadura do caldo de enriquecimento em placas contendo ágar Palcam e Oxford, com a identificação das colônias suspeitas através de testes bioquímicos tradicionais. Das 133 amostras, 51% apresentaram populações de microrganismos psicrotróficos aeróbios > 10⁶ UFC/g e 42% apresentaram populações de *Enterobacteriaceae* entre 10⁵ – 10⁶ UFC/g. Coliformes fecais estiveram presente em populações superiores a 10² UFC/g em 97 amostras (73%) e *Salmonella* foi detectada em 4 amostras (3%). *L. monocytogenes* estava presente em 1 (0.6%) amostra de espinafre das 181 amostras examinadas, tendo sido detectada, simultaneamente, por ambos os métodos empregados. As outras espécies de *Listeria* encontradas, empregando-se a semeadura em placa foram: *L. welshimeri* (1 amostra de alface mimosa) e *L. innocua* (2 amostras de agrião). Os resultados indicam que grande parte dos vegetais MP examinados, apresentaram qualidade microbiológica deficiente e podem ser veículos de patógenos como a *Salmonella*. O BAX[®]System é de grande utilidade para as análises de vegetais MP, que permite a obtenção de resultados mais rapidamente que o método tradicional, sem perda na sensibilidade e na especificidade.

ABSTRACT

The increasing demand for fresh fruits and vegetables, associated with the desire of convenient goodies, is causing an expansion on the market share of minimally processed products (MP). Minimal processing includes operations such as washing, cutting, peeling and packaging of the product. Amongst pathogenic microorganisms that can be transmitted by MP vegetables are: *Listeria monocytogenes* (Lm), *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* sp. Searching for these microorganisms is labor intense and time-consuming, however new methods for fast detection of pathogens are commercially available. Methods employing molecular technology are becoming more popular and the polymerase chain reaction (PCR) is now a good choice. There is an automatized PCR system (BAX[®]System) that can be used for Lm detection in up to 54 h. The aims of this study was to evaluate the microflora of MP vegetables and to evaluate the effectiveness of the BAX[®]System for screening Lm on those products. From March to July 2003, 181 samples of MP salads were collected at retail level in the city of São Paulo, SP. Total and faecal coliforms, *Enterobacteriaceae*, psychrotrophic microorganisms enumeration and *Salmonella* evaluation were conducted in 133 samples. *L. monocytogenes* was assessed in 181 samples using the BAX[®]System and also by plating the enrichment broth onto palcam and Oxford agars. Suspected colonies of *Listeria* were submitted to classical biochemical tests. Population of psychrotrophic microorganisms >10⁶ CFU/g was observed in 51% of the 133 samples and *Enterobacteriaceae* population between 10⁵ - 10⁶ CFU/g was in 42%. 97 samples (73%) showed population of faecal coliforms >10² CFU/g (Brazilian standard) and *Salmonella* was detected in 4 samples (3%). *L. monocytogenes* was detected in 1 spinach sample (0,6%) out of the 181 examined MP vegetables. This positive sample was simultaneously detected by both methods. The other *Listeria* species identified by plating were *L. welshimeri* (1 sample of curly lettuce) and *L. innocua* (2 watercress samples). The results indicate that the MP vegetables had poor microbiological quality and could be vehicle of pathogens such as *Salmonella*. BAX[®]System showed good specificity and sensitivity when used for vegetable analysis and was easier to perform and faster than the classical method.

1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são provavelmente o problema de saúde mais evidente no mundo contemporâneo, devido à emergência de novos microrganismos patogênicos, à re-emergência de outros e ao desenvolvimento de novos produtos alimentícios. Ocasionalmente, também, perdas significativas na produtividade econômica. A incidência das DTA vem aumentando, de forma considerável, devido a vários fatores que incluem as mudanças no estilo de vida da população, que tem dedicado um menor tempo ao preparo de suas refeições, preferindo consumir alimentos já prontos para o consumo, o modismo, que prefere

alimentos crus ou minimamente processados com características próximas às dos “in natura”, e o aumento da população de grupos considerados de risco formada principalmente por idosos e indivíduos imunocomprometidos (Landgraf, 2002).

Um dos grupos de alimentos que vem ganhando mercado em decorrência dessa praticidade no consumo são os vegetais folhosos minimamente processados. Estes produtos são submetidos a um processamento mínimo que tem, como principal objetivo, tornar o produto pronto para o consumo, garantir suas características de frescor, atendendo, assim, à demanda do consumidor por produto mais conveniente, fresco e saudável (Alzamora et al., 2000).

Em 2002, no Estado de São Paulo, foram produzidas 2000 toneladas / mês de vegetais minimamente processados (MP), sendo 90% hortaliças. A produção é destinada principalmente a cozinhas industriais e institucionais, mas 30% já são comercializados em supermercados (Carrara Jr., comunicação pessoal).

Uma ou várias operações, incluindo a seleção, lavagem, descascamento e/ou corte, sanificação ou tratamento térmico e embalagem, são aplicadas nesse tipo de produto MP, permitindo, assim, o consumo direto do vegetal folhoso. Porém, nenhuma dessas operações garante a esterilidade ou estabilidade do produto e, por isso, devem ser mantidos sob refrigeração (Nguyen-the, Carlin, 1994; Alzamora et al., 2000).

Os alimentos de origem vegetal são diferentes na sua composição química e, conseqüentemente, os parâmetros de deterioração microbiológica diferem substancialmente. A integridade estrutural destes produtos é dependente de celulose e da pectina (Lund, 1992), e sua manutenção é importante para minimizar a deterioração.

Quando a qualidade da matéria-prima e as condições do processamento e de conservação são afetadas, permitindo a contaminação, a sobrevivência e/ou multiplicação de microrganismos, inclusive os patogênicos, o aspecto saudável desse tipo de produto é comprometido (Nguyen-the, Carlin, 1994; Alzamora et al., 2000).

A forma como esses vegetais MP apresentam-se depende da sua própria natureza, do processo aplicado, sendo produtos inteiros, cortados ou picados. Neste

último caso, o rompimento dos tecidos favorece a deterioração, tanto de natureza química como microbiológica. No aspecto químico, há a liberação dos fluidos internos, incluindo minerais, açúcares, substâncias pectínicas e fenólicas, álcoois, hormônios, vitaminas e alcalóides. Essa perda de líquido celular, incluindo a ação de enzimas provocam um rápido escurecimento. Já a deterioração microbiana é causada pela ação de microrganismos remanescentes do processamento que se manifestam, seletivamente, em função das condições do processamento utilizado (Lund, 1992; Nguyen-the, Carlin, 1994; Alzamora et al., 2000; Vilela, Henz, 2000).

Considerando os vegetais frescos em geral, a contaminação ou presença de microrganismos patogênicos pode ocorrer em diferentes fases, desde a sua produção no campo até o consumidor final. Na fase de produção agrícola, a contaminação pode ser oriunda do solo contaminado, da água de irrigação, do adubo orgânico, proveniente de fezes de animais (domésticos ou silvestres), entre outros (Beuchat, 1996a).

Além disso, a água da chuva e os insetos também são considerados potenciais veículos de contaminação bacteriana, assim como a alta umidade relativa, que favorece a sobrevivência e multiplicação de bactérias aderidas à superfície da planta (Lund, 1992). Por outro lado, a espessura do tecido da folha e a casca conferem uma proteção adicional aos vegetais contra danos superficiais que podem, eventualmente, causar a deterioração dos mesmos (Brackett, Splittstoesser, 2001).

A contaminação, na colheita ou no processamento, pode ocorrer de forma cruzada com os operadores, equipamentos, contêineres, durante o armazenamento e o transporte. Os microrganismos que permaneceram no vegetal folhoso embalado podem multiplicar-se, dependendo do tempo e da temperatura de conservação e, além disso, pela alta umidade na embalagem gerada pela respiração da hortaliça. Na fase de comercialização podem atingir níveis populacionais que comprometem a qualidade do produto e colocam em risco a saúde do consumidor (Beuchat, 1996b).

A demanda por vegetais MP, por serem naturais e saudáveis, tem aumentado e a necessidade de torná-los estáveis e seguros representa um desafio para pesquisadores e processadores. O aumento de tempo entre processamento e

consumo poderá contribuir para maiores riscos de doenças veiculadas por estes alimentos (Alzamora, et al., 2001).

Na ânsia de prolongar a vida de prateleira dos seus produtos e oferecer um produto mais próximo do natural, as indústrias de alimentos, muitas vezes, adotam processos tecnológicos como, por exemplo, embalagens com atmosfera modificada, cuja influência sobre o comportamento dos microrganismos ainda não está totalmente elucidada.

Embora perigos químicos e físicos sejam preocupantes, os perigos específicos para frutas e vegetais MP, residem principalmente nos contaminantes microbianos. Fungos e bactérias conseguem se multiplicar na superfície das hortaliças, entretanto, as bactérias se multiplicam mais rapidamente do que os bolores e leveduras. Por esta razão, os grupos de microrganismos encontrados nos vegetais recém-colhidos são bastante variados. Todas as hortaliças possuem uma microbiota residente que normalmente resiste às baixas concentrações de carboidratos, proteínas e sais inorgânicos (Brackett, Splittstoesser, 2001).

A maioria das bactérias que está aderida à superfície dos produtos recém colhidos é saprofítica e consiste de gêneros Gram-negativo. Alguns dos patógenos associados aos produtos agrícolas “in natura” incluem: *Yersinia enterocolitica*, espécies de *Salmonella*, espécies de *Shigella*, *Citrobacter freundii*, cepas enteropatogênicas de *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila* e *A. caviae*, vírus da hepatite A, etc. (Alzamora, 2001; Brackett, Splittstoesser, 2001; Lund, 1992; Nguyen-the, Carlin, 1994). Entretanto, como os vegetais folhosos estão em contato direto com o solo, bactérias Gram-positivas também podem estar presentes, como *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Cl. botulinum* e *Listeria monocytogenes* (Lund, 1992; Brackett, Splittstoesser, 2001).

Uma vez colhidos, os vegetais entram imediatamente no processo de senescência que os torna mais sensíveis à deterioração microbiana. A distribuição da população de microrganismos nos vegetais não ocorre de forma homogênea, ou seja, a parte externa da folha pode conter populações de bactérias aeróbias mesofílicas acima de 10^4 UFC/g, porém, na parte interna, o número de microrganismos pode ser $<10^2$ UFC/g (Brackett, Splittstoesser, 2001). Vários fatores

são responsáveis por esse grau de variação, incluindo as condições ambientais, a presença de animais e/ou insetos, destruição física que podem contribuir na diferença da população microbiana. Além disso, segundo os autores, a detecção de microrganismos tradicionalmente indicadores de contaminação fecal, como os coliformes fecais, tem pouca ou nenhuma relação com contaminação fecal dos vegetais, já que a maioria dos gêneros faz parte da microbiota presente nestes produtos.

Para sanificar frutas e hortaliças, um dos agentes mais utilizados pelos processadores é o cloro, nas suas diferentes composições. Este sanitizante quando utilizado *in vitro* apresenta uma ampla e rápida atividade antimicrobiana contra vários microrganismos. Entretanto, a eficiência dos compostos clorados pode ser prejudicada pela sua incapacidade de atuação na superfície cerosa da cutícula dos vegetais, ou pela formação de biofilmes na superfície dos mesmos (Nguyen-the, Carlin, 1994).

A microbiota pode variar consideravelmente, dependendo do tipo de vegetal, condições ambientais e sazonalidade. A maneira como esses vegetais são armazenados poderá permitir o desenvolvimento de grupos particulares de microrganismos (Brackett, 2001) e, dentre estes, cabe destacar o patogênico psicrotrófico *L. monocytogenes*.

Listeria sp. encontra-se amplamente distribuída na natureza, fato que explica a facilidade com que é encontrada em alimentos, desde a produção até o consumo (Beuchat, 1996b).

A pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo é de grande importância, pois sabe-se que os alimentos envolvidos em surtos e casos esporádicos de listeriose são aqueles processados industrialmente, mantidos sob refrigeração, com vida de prateleira longa, e que oferecem condições adequadas para a sua multiplicação (Swaminathan, 2001).

Listeria monocytogenes é uma bactéria ubíqua, com capacidade de se desenvolver em condições inóspitas para outros microrganismos patogênicos, que pode iniciar multiplicação em temperaturas que variam de 0 a 45°C (Swaminathan, 2001).

Segundo o Manual de Bergey (Hensyl, 1994), *Listeria* é um bacilo pequeno (0,5 µm de diâmetro e 1-2 µm de comprimento), regular, Gram-positivo, que pode se apresentar em unidades ou em cadeias pequenas. Não forma esporos, produz catalase, mas não oxidase. É móvel a 25°C, com movimento característico de tombamento, e é imóvel a 35°C. É anaeróbio facultativo (Hensyl, 1994). A multiplicação ocorre rapidamente na maioria dos meios bacteriológicos utilizados na rotina laboratorial (Ryser, Donnelly, 2001).

O pH de multiplicação de *L. monocytogenes* varia entre 4,4 e 9,6, mas se multiplica melhor entre 6 e 8, sendo 7,0 o pH ótimo (Rocourt, 1999). Por ser ácido-tolerante, pode sobreviver em alimentos de baixa acidez por dias ou semanas (Ryser, Donnelly, 2001). *Listeria* é um dos poucos microrganismos patogênicos que pode se multiplicar em substratos com atividade de água tão baixa quanto 0,93 e em meio de cultura com 10% de NaCl (Farber et al., 1992; Rocourt, 1999).

Listeria necessita de vários aminoácidos para seu desenvolvimento, entre eles, cisteína, leucina, isoleucina, arginina, valina, riboflavina, biotina, metionina e, sua multiplicação, é estimulada por Fe³⁺ e fenilalanina. Glicose e glutamina são necessárias como fontes primárias de carbono e nitrogênio (Rocourt, 1999).

Sete espécies de *Listeria* são reconhecidas: *L. innocua*, *L. grayi* e *L. murrayi*, consideradas não-patogênicas, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. welshimeri* raramente causam infecções nos humanos, enquanto *L. monocytogenes* é patogênica e a mais importante espécie nos casos de infecções transmitidas pelos alimentos (Franco, Landgraf, 1996; Rocourt, 1999).

L. monocytogenes pode ser dividida em subtipos por vários métodos, sendo o mais comum baseado no reconhecimento de antígenos de superfície por anticorpos específicos (Franco, Landgraf, 1996.) São conhecidas 13 sorovariedades, mas somente três sorotipos (4b, 1/2a e 1/2b) são responsáveis por 89 a 96% dos casos de listeriose humana (ICMSF, 1996; Tompkim, 2002), com predomínio do sorotipo 4b nos casos de doença (Zheng, Kathariou, 1995; Louie et al., 1996). Esse sorotipo (4b) é responsável por 33 a 50% de casos esporádicos em humanos (Swaminathan, 2001).

A hemolisina é o mais importante fator de virulência da *Listeria* e três espécies, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*, são hemolíticas (Gouin et al., 1994).

Dentre os alimentos já envolvidos nos surtos de listeriose, têm-se leite cru e pasteurizado, queijos, carnes bovina, suína, de aves e seus derivados, frutos do mar, além de produtos de origem vegetal, crus ou processados, e refeições preparadas (Franco, Landgraf, 1996; Ryser, Donnelly, 2001).

Diversas formas de transmissão do microrganismo a humanos já foram relatadas, mas a via alimentar parece ser a mais preocupante. Entretanto, o risco de desenvolver uma infecção por *L. monocytogenes*, após a ingestão de um produto contaminado, é baixo para a população em geral (CDC, 1999).

A ingestão de alimentos contaminados pelo microrganismo é particularmente perigosa para gestantes, indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida ou portadores de HIV, cirrose, carcinoma e outras doenças que provocam comprometimento do sistema imunológico (Slutsker, Schuchat, 1999), mas a doença pode ocasionalmente ocorrer em indivíduos não predispostos (Ryser, Donnelly, 2001). Idosos e recém-nascidos também são suscetíveis à listeriose e enquadrados como indivíduos de alto risco (FDA, 2003).

Atualmente, sabe-se da existência de dois “tipos” de listeriose humana: um relacionado à forma mais grave da doença e que compromete principalmente o sistema nervoso central, manifestando-se através da meningite, encefalite, septicemia e abscessos, ou provocando aborto no 2º ou 3º trimestre e nascimento de feto prematuro. Endocardites e osteomielites também podem ocorrer, mas são raras. O período de incubação da listeriose pode variar de um dia a algumas semanas (Slutsker; Schuchat, 1999).

O segundo tipo, mais brando, é uma doença gastrointestinal autolimitada e não invasiva, caracterizada pelo desenvolvimento de febre, diarreia, náusea, vômito, dor de cabeça e mialgia, após 12 a 24 horas de exposição (Salamina et al., 1996).

A dose mínima de infecção não foi ainda estabelecida, mas informações sobre a população de *L. monocytogenes* em alimentos contaminados envolvidos em surtos indicam que populações entre 10^3 – 10^4 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/g

de alimento foram responsáveis pela doença (Duffy et al., 1999). Entretanto, estudo realizado na Finlândia indica que a exposição da população de risco a doses baixas [0,3 Número Mais Provável (NMP)/g] de *L. monocytogenes*, por períodos prolongados, pode também levar ao desenvolvimento da doença (Maijala et al., 2001).

Apesar de *Listeria monocytogenes* causar uma doença de baixa morbidade (0,3 – 1 caso / 100.000 pessoas / ano) nos Estados Unidos, sua importância está na elevada mortalidade associada a ela (FDA, 2003).

Nos Estados Unidos, um total de 466 casos de listeriose ocorreu durante doze surtos entre 1970 a 2002. Quatro grupos de alimentos foram responsáveis pelos casos de doença: produtos de laticínios, produtos cárneos, vegetais e ovos. Nove destes surtos foram associados a um único veículo, sendo os laticínios responsáveis por quatro surtos, carnes por três, e um surto atribuído a vegetais e outro a ovos. Os três surtos restantes foram atribuídos a mais de um veículo (FDA, 2003).

Dados dos Estados Unidos indicam que nos últimos anos está ocorrendo um declínio na incidência de infecções causadas por alguns patógenos como, por exemplo, *Campylobacter* e alguns sorovares de *Salmonella*. Entretanto, o mesmo levantamento mostra que o número de infecções causadas por *Listeria* não tem diminuído significativamente (CDC, 2004).

L. monocytogenes está amplamente distribuída em plantações de hortaliças, sendo possível seu isolamento de diferentes nichos ecológicos (Beuchat et al., 1996a). Plantas e suas partes comestíveis podem apresentar *L. monocytogenes*, aderida superficialmente devido à formação de biofilmes. Isso poderá ter um importante papel na disseminação do patógeno do habitat natural para a indústria, contaminando os equipamentos, contêineres, os depósitos e/ou locais de armazenamento.

A sobrevivência e multiplicação de *L. monocytogenes* em produtos “in natura” são afetadas por diferentes fatores, tais como idade e tipo de produto, nível de contaminação, temperaturas de armazenamento e atmosfera (Bennik, et al., 1996).

A ocorrência de *L. monocytogenes* conduziu a uma preocupação para avaliar o comportamento do patógeno inicialmente em vegetais “in natura” e, depois, nos prontos para o consumo (Brackett, 1999).

Um dos trabalhos pioneiros sobre listeriose em humanos foi publicado por Blenden, Szatalowicz, em 1967, nos Estados Unidos. Estes pesquisadores fizeram um estudo sobre os aspectos ecológicos da listeriose e verificaram que 731 casos da doença em humanos haviam sido relatados no período de 1933 a 1966. Como não haviam dados sobre os veículos das infecções, os autores levantaram diversas hipóteses para explicá-las. Dentre as hipóteses, uma que, posteriormente, pode ser confirmada, é a importância dos vegetais como veículo de *L. monocytogenes*.

Epidemiologicamente, os dois primeiros grandes surtos alimentares causados por *L. monocytogenes* foram relacionados a vegetais. Em 1981, no Canadá, ocorreram 41 casos, envolvendo 7 adultos e 34 crianças, e o alimento responsável foi salada de repolho tipo “coleslaw”, contaminada por *L. monocytogenes*. Das pessoas envolvidas, 15 crianças (44%) e 2 adultos morreram, sendo a taxa de mortalidade de 41% (Schlech et al., 1983; Slutsker, Schuchat, 1999).

Ho et al. (1986) relataram o surto ocorrido em Massachusetts em 1979 envolvendo 20 pacientes de um hospital, com 5 óbitos. O alimento incriminado foi salada de alface e salsão.

Durante o período de 1980 a 1999, ocorreram 12 surtos de listeriose em diferentes países, sendo que o maior deles envolveu 1566 pessoas e ocorreu na Itália em 1997. Este surto foi provocado pela ingestão de salada de milho (Schlech, 2000; Aureli et al., 2000).

Pesquisas têm demonstrado que bactérias patogênicas, como por exemplo *L. monocytogenes*, podem sobreviver e multiplicar em diferentes tipos de vegetais incluindo broto de feijão, pepino, batata, tomate, repolho, couve-flor, alface, rabanete, cogumelos, dentre outros (Beuchat et al., 1986; Beuchat, Brackett, 1990; Lin et al., 1996; Lund, 1992; Sizmur, Walker, 1988).

Com relação à presença de *Listeria* sp. ou *L. monocytogenes* em vegetais “in natura”, MP, ou prontos para o consumo, há uma grande variação nos resultados publicados.

Em 1988, no Reino Unido, Sizmur, Walker, detectaram *L. monocytogenes* em 4 de 60 saladas pré-embaladas prontas para o consumo (incluindo brotos de feijão, saladas de hortaliças mistas e saladas contendo nozes e frutas). Eles verificaram também que as populações de *L. monocytogenes*, naturalmente presentes em alguns tipos de salada, aumentaram aproximadamente duas vezes, após 4 dias de armazenamento sob refrigeração (4°C).

Numa pesquisa conduzida por Heisick et al. (1989), nos Estados Unidos, constatou-se que, das 1000 amostras de 10 tipos diferentes de vegetais frescos não-lavados, *L. monocytogenes* foi isolada de repolho, pepinos, batatas e rabanetes. Outras espécies de *Listeria* foram isoladas de pepinos, alface, cogumelos, batatas e rabanetes. O gênero não foi detectado em brócolis, cenoura, couve-flor e tomates.

Harvey, Gilmour (1993), na Irlanda do Norte, relataram que 7, das 85 amostras de saladas de vegetais e saladas preparadas analisadas, continham *L. monocytogenes*. Os autores sugerem que a contaminação foi devido à manipulação imprópria e não oriunda do produto "in natura".

Uma pesquisa conduzida na Malásia (Arumugaswamy et al., 1994) avaliou a ocorrência de *L. monocytogenes* em 22 amostras de vegetais folhosos crus e em 5 amostras de pepinos fatiados. *L. monocytogenes* foi detectada em 5 (23%) amostras de vegetais e em 4 (80%) das de pepino.

Saladas de hortaliças também foram examinados por Lin et al. (1996), nos Estados Unidos. Das 63 amostras analisadas, *L. monocytogenes* foi encontrada em 1 (1,6%) amostra de salada contendo alface americana, repolho roxo, cenouras, pepinos e tomates. Os autores mencionam que todos estes vegetais são fontes potenciais de contaminação e já estiveram envolvidos em surtos de listerioses. Eles afirmam ainda que, a manipulação indevida, transporte e o preparo dos vegetais podem contribuir na contaminação do produto com o patógeno.

Um estudo para avaliar a qualidade de salada de repolho foi realizada por Monge, Arias (1996), na Costa Rica. Eles verificaram que, das 50 amostras avaliadas, *L. monocytogenes* estava presente em 10 (20%).

Odumeru et al. (1997), no Canadá, analisaram tanto amostras de vegetais não-processados quanto prontos para o consumo e constataram uma frequência de 6,1% de *L. monocytogenes* nos produtos minimamente processados.

Um trabalho de investigação da ocorrência de *Listeria* spp. em 2 tipos (americano e europeu) de saladas de vegetais minimamente processados, embalados em polipropileno, foi realizado na Venezuela, por Diaz et al. (1998). Os resultados revelaram que *Listeria* sp. estava presente em 37,5% nas saladas do tipo europeu e em 25%, nas do tipo americano.

Nørrung et al. (1999), na Dinamarca, examinaram 350 amostras de brotos e de vegetais cortados e constataram uma alta ocorrência de *L. monocytogenes*. Segundo os limites estabelecidos naquele país, populações de *L. monocytogenes* entre 10 e 100 UFC/g são consideradas insatisfatórias e >100 UFC/g não são aceitáveis. Dentre as amostras examinadas, 23% estavam em condições insatisfatórias.

No Brasil, Porto, Eiroa (2001) analisaram 101 amostras de alface e 149 amostras de outros vegetais, coletadas em diferentes épocas do ano. Os resultados revelaram baixa contaminação (3,2%) por *L. monocytogenes*, detectando-se o microrganismo em amostras de alface, salsa e agrião.

Em Portugal, Guerra et al. (2001) analisaram 37 amostras de frutas e hortaliças prontas para o consumo e de hortaliças “in natura”, e não encontraram *L. monocytogenes* nas amostras.

Da mesma forma, Petran et al. (1988), nos Estados Unidos, também não detectaram *L. monocytogenes* em amostras de vegetais comercializados frescos ou congelados.

Outro estudo com resultados semelhantes foi realizado no Canadá por Farber et al. (1989) que não encontraram *Listeria* spp. em 110 amostras de vegetais “in natura”, incluindo alface, aipo, tomate e rabanete.

Na Índia, Pingulkar et al. (2001), examinando 116 amostras de vegetais diversos, não isolaram *L. monocytogenes* nas saladas prontas para o consumo analisadas.

Soriano et al. (2001), na Espanha, pesquisaram a presença de espécies de *Listeria* em 40 amostras de alface e espinafre, 20 “in natura” e 20 prontas para o consumo. Os resultados revelaram uma frequência de 30% de *L. grayi* e *ivanovii*, 20% de *L. seeligeri* e 10% de *L. monocytogenes* nas amostras de alface “in natura”. Nas amostras de alface pronta para o consumo, verificou-se a presença de *L. grayi* em 30%; *L. ivanovii* e *L. monocytogenes* em 10%. No espinafre “in natura”, *L. grayi* foi detectada em 10% das amostras e o gênero *Listeria* não foi encontrado no produto pronto para o consumo.

Johannessen et al. (2002), na Noruega, avaliaram 200 amostras de diferentes tipos de alface e 100 amostras de saladas pré-cortadas. *L. monocytogenes* estava presente em 1 (0,5%) amostra de alface e, nas saladas, o microrganismo não foi encontrado. Os pesquisadores sugerem que a ausência de *L. monocytogenes* em certos produtos pode ser atribuída ao pouco contato da planta com o solo.

Amostras prontas para o consumo também foram analisadas por Sagoo et al. (2003a, b) no Reino Unido. Os resultados de ambos estudos revelaram uma baixa ocorrência de *L. monocytogenes*, que variou entre 2,3 e 3% do total de amostras (2950 e 3852, respectivamente).

1.1. Métodos de detecção de *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é um microrganismo não facilmente diferenciado das outras espécies de *Listeria* não patogênicas. Vários métodos convencionais, como os da International Organization for Standardization (ISO, 1996), United State of Department of Agriculture – Food Safety and Inspection Service (USDA – FSIS, 1989); Bacteriological Analytical Manual (BAM) (Hitchins, 1998) e AOAC Internacional, (AOAC, 1999), requerem vários dias e um grande número de provas bioquímicas para a identificação e diferenciação das espécies (Hochberg et al., 2001). Na tentativa de melhorar a capacidade de detecção de *L. monocytogenes* e tornar os resultados mais rápidos e confiáveis, estes métodos, apesar de aceitos, sofrem constantes modificações (Donnelly, 1999).

Apesar do longo tempo envolvido na sua execução, do volume de trabalho e do custo em termos de vidraria, equipamentos de laboratório (estufas, geladeiras, autoclaves, contadores, etc.) e suprimentos, os métodos convencionais apresentam a grande vantagem de serem utilizados já há muito tempo e de serem reconhecidos como oficiais, tanto nacional como internacionalmente (Franco, 1994).

Métodos alternativos para detectar *L. monocytogenes* têm sido desenvolvidos, mas, geralmente, requerem tempo próximo ao do convencional para o procedimento de confirmação para resultados positivos presuntivos.

Na pesquisa de *Listeria* uma etapa inicial de enriquecimento é quase sempre usada para facilitar a recuperação de organismos injuriados que podem ser encontrados em amostras de alimentos processados. Além disto, ela pode promover a multiplicação seletiva do organismo alvo.

Gray et al. (1948) descreveram um dos primeiros protocolos de enriquecimento de *Listeria*, em que amostras eram mantidas a frio (4°C), em meio não-seletivo, por vários meses. Desta maneira, conseguiam limitar o crescimento de organismos competidores e tirar proveito da característica psicrófila de *Listeria*. Embora o método de enriquecimento a frio tenha mostrado alta sensibilidade, o tempo para a obtenção dos resultados limitou seu potencial para aplicação prática como um método de detecção (Donnelly, 1999).

Esforços para reduzir o tempo de recuperação e o isolamento de *Listeria* spp. em matrizes complexas e amostras ambientais resultaram no desenvolvimento de diferentes caldos de enriquecimento e ágar seletivos e diferenciais (Donnelly, 1999).

Os protocolos de dois métodos, o do FDA (Food and Drug Administration) (Hitchins, 1998) e o do USDA – FSIS (Johnson, 1998), são os protocolos mais comumente usados nos Estados Unidos para pesquisa de *L. monocytogenes*. Muitos relatos encontrados comparam estes métodos, demonstrando que cada um possui vantagens e desvantagens quando aplicados para isolamento de *L. monocytogenes* de um determinado tipo de alimento (Donnelly, 1999).

Segundo Norton (2002), o método do FDA é mais eficiente para isolamento do patógeno tanto quando baixas populações de *Listeria* sp. estão presentes, como

quando células estressadas ou injuriadas do gênero estão nos alimentos que apresentam baixa carga microbiana. O método USDA-FSIS, que usa duas etapas de enriquecimento, possui alta sensibilidade para as amostras com elevada microbiota acompanhante.

A aplicação rotineira destes métodos pelos laboratórios e indústrias alimentícias, entretanto, é limitada pelo tempo para obtenção de resultados negativos que é de, no mínimo, 3 dias a partir da amostragem. Já para a identificação de *L. monocytogenes*, leva-se até 7 dias a partir do isolamento da colônia (Hitchins, 1998).

Outro problema associado aos métodos convencionais, é que células de *L. monocytogenes* injuriadas podem não se recuperar nos meios empregados, ou outras espécies de *Listeria* podem multiplicar-se mais rapidamente, sobrepondo-se à população de *L. monocytogenes*. Com isso, há possibilidade de resultados falso-negativos. Outros microrganismos acompanhantes podem também se multiplicar mais rapidamente que *L. monocytogenes*, interferindo na sua detecção (Donnelly, 1999; Petran; Swanson, 1993).

Na tentativa de buscar métodos mais rápidos e sensíveis para a detecção deste patógeno e graças aos avanços na biotecnologia, diversos métodos para detecção de *L. monocytogenes* foram desenvolvidos. Ensaio rápidos que usam técnicas imunoquímicas, hibridização e amplificação de ácido nucleico, oferecem mais sensibilidade e especificidade do que métodos baseados em cultura, além de permitir a redução do tempo para obtenção de resultados. Muitos métodos alternativos atingiram um elevado nível de automação, facilitando sua aplicação na detecção rotineira de microrganismos (Norton, 2002).

Vários são os métodos não convencionais para a pesquisa de *Listeria* sp. em alimentos, porém poucos são específicos para *L. monocytogenes*. De modo geral, todos os testes requerem um enriquecimento primário, para aumentar seletivamente a população alvo para níveis detectáveis (Rocourt, 1999).

Devido à tolerância zero para *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo em alguns países e à freqüente presença de baixas populações de *L. monocytogenes* nos alimentos em geral (Zhang et al., 2004), o método de escolha deve ser muito sensível, capaz de detectar 1 célula / g do produto (Ingianni et al.,

2001) e apresentar alta especificidade, prevenindo a ocorrência de resultados falso-positivos.

Um teste ótimo para utilização em rotina deve ser de fácil execução por técnicos não especializados, específico para *L. monocytogenes*, rápido, com a possibilidade de obter-se o resultado em poucas horas ou um dia, adequado para automação e não deve ter um custo elevado (Ingianni et al., 2001).

A obtenção de resultados em um período curto de tempo possibilita eventuais correções durante o processamento do alimento, a retirada de um lote do comércio e, para produtos frescos, a comercialização mais rápida (Barbuti et al., 2000).

Dentre os métodos que podem atender às exigências anteriores, têm-se aqueles que empregam a tecnologia da amplificação do DNA cromossômico (PCR – reação de polimerização em cadeia).

Poucos desenvolvimentos têm revolucionado tantos campos quanto a PCR. Conceitualizado por Kary Mullis em 1985, a PCR é um processo enzimático, *in vitro*, para amplificação de uma seqüência específica de ácido desoxirribonucleico (DNA) (Farber, 1996).

Brevemente, dois “primers” específicos (pequenos fragmentos de DNA fita simples, com orientações opostas) flanqueiam a seqüência de DNA a ser amplificada e, pela ação da enzima DNA polimerase, sintetizam uma cópia da região do DNA delimitada por eles.

A reação envolve 3 etapas: (i) denaturação do DNA molde em uma fita simples, (ii) anelamento ou hibridização dos “primers” às regiões complementares ao DNA molde, e (iii) extensão e síntese do fragmento de DNA. Este ciclo é repetido por 20 - 40 vezes, sendo que cada novo fragmento sintetizado serve como um molde nos ciclos subseqüentes resultando em um aumento exponencial no número de cópias da região do DNA alvo (Farber, 1996).

A principal vantagem da aplicação de métodos baseados na amplificação de DNA é a estabilidade destas seqüências que não são afetadas por condições ambientais ou de cultivo.

Um método comercial que se baseia na PCR é o BAX[®] System, da DuPont, divisão Qualicon.

O sistema de detecção de patógenos BAX[®] é um método de análise microbiológica que pode ser empregado tanto para alimentos como para amostras ambientais (User's Guide, 2000).

O sistema BAX[®] (figura 1) é automatizado e permite a detecção em tempo real da presença do patógeno. Segundo a empresa responsável, os “primers” utilizados são altamente específicos para a detecção de *L. monocytogenes*, sendo baixa a possibilidade de reação cruzada com outras espécies do gênero (User's Guide, 2000).

O teste consiste de um enriquecimento inicial da amostra de alimento, segundo um protocolo específico para o tipo de alimento. As amostras são, então, combinadas com uma solução de lise e tratadas termicamente, o que leva à liberação do DNA. Os reagentes necessários para a PCR e mais o corante fluorescente “SYBR Green”, peletizados e pré-distribuídos em tubos de reação, são reidratados com a amostra lisada. Estes tubos são transferidos ao termociclador / detector, onde ocorre a amplificação do fragmento de DNA específico do microrganismo. O DNA amplificado gera um sinal fluorescente que é interpretado pelo sistema BAX[®]. Os resultados são, então, mostrados no monitor como símbolos positivos ou negativos (User's Guide, 2000). O processo de amplificação leva cerca de três horas e meia para ser completado.

Na figura 2, tem-se a representação esquemática do protocolo, recomendado pelo fabricante para pesquisa de *L. monocytogenes* em amostras de alimentos.

a.

b.

c.

Figura 1. O sistema BAX[®] automatizado. a – o equipamento. b – os insumos. c – exemplo de gráfico da curva de fusão (“melting curve”).

Figura 2. Representação esquemática das etapas necessárias para pesquisa de *L. monocytogenes* empregando o sistema BAX[®] automatizado.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- 1) Estudar a ecologia microbiana de vegetais folhosos minimamente processados.
- 2) Avaliar o emprego do BAX[®]System para detecção de *Listeria monocytogenes* em saladas de hortaliças folhosas minimamente processadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Foram examinadas 181 amostras de hortaliças folhosas minimamente processadas, de diferentes marcas comerciais, adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de São Paulo – SP. As amostras foram transportadas para o laboratório em temperatura ambiente e mantidas sob refrigeração até o momento do processamento. Os diferentes tipos de vegetais folhosos examinados encontram-se na Tabela 1.

3.1.1. Preparo das amostras

A superfície da embalagem plástica contendo o vegetal foi sanitizada com álcool 70% e, após abertura em capela de fluxo laminar, o vegetal foi cortado, com auxílio de bisturi estéril, em pequenos pedaços, que foram transferidos para embalagens plásticas estéreis.

3.2. Métodos

3.2.1. Pesquisa de *Listeria* sp. pelo método convencional

Foram usados os enriquecimentos sugeridos pelo sistema BAX[®]. Uma porção de 25 gramas da amostra foi pesada, homogeneizada em 225 mL de caldo Demi-Fraser (Difco, USA) e foi incubada a 30°C por 22-24 h. Em seguida, 100µL deste caldo foram transferidos para um tubo, contendo 9,9 mL de caldo MOPS-BLEB (caldo tamponado para enriquecimento de *Listeria*) (Sigma, USA; BBL, USA), que foi incubado a 35°C por 18-24 h. Alíquotas de MOPS-BLEB de cada amostra foram semeadas superficialmente em placas de ágar Palcam e Oxford (ambos Oxoid, Reino Unido), que foram incubadas a 37°C/48 h.

Três colônias características de *Listeria*, de cada um dos meios, foram repicadas em placas contendo ágar soja tripticaseína, adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE, ambos Oxoid), e incubadas a 37°C/24 h para verificação de sua pureza. As placas foram examinadas sob transiluminação e as colônias características foram submetidas à identificação bioquímica.

A identificação das cepas isoladas foi feita segundo Pagotto et al. (2001), utilizando-se os testes para produção de catalase e β -hemólise; fermentação de carboidratos (xilose, manitol, ramnose e dextrose) e motilidade em ágar semi-sólido.

Na figura 1, tem-se a representação esquemática da metodologia convencional.

3.2.2. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* empregando-se o BAX[®]System

O método alternativo empregado, BAX[®]System, foi utilizado segundo as especificações do fabricante, descritas a seguir. A partir de tubos de caldo MOPS-BLEB, incubados por 18-24 h (3.2.1.), porção de 5 µL foi transferida para tubos Eppendorf (Bioexpress, USA) e combinada com 200 µL de solução de protease em tampão fosfato, que acompanha o kit, aquecendo-se a mistura por 60 minutos a 55°C. A seguir, aqueceu-se a 95°C por 10 minutos, transferindo-se, então, os tubos para um bloco de resfriamento (“cooling block”), com temperatura de 2-8°C, onde permaneceram por 5 minutos. Após resfriamento, 50 µL foram transferidos para os tubos de PCR que acompanham o kit. Nesses tubos, na forma peletizada, encontram-se os primers, os dNTPs, a *Taq*, o corante fluorescente, o controle interno e demais reagentes necessários para a PCR.

Os tubos foram transferidos para o termociclador / detector, onde o programa pré-estabelecido no hardware do equipamento foi executado. Ao final do ciclo de amplificação e detecção, o equipamento automaticamente libera os resultados na tela do microcomputador como positivo ou negativo.

Na figura 1, tem-se a representação esquemática da metodologia alternativa.

3.2.3. Avaliação da microbiota dos vegetais MP

Na figura 2, encontra-se a representação esquemática da metodologia analítica empregada.

3.2.3.1. Diluição das amostras

Porções de 25 gramas do vegetal minimamente processado preparadas, conforme descrito em 3.1.1., foram homogeneizadas com 225 mL de solução salina 0,85% (Synth, Brasil). A partir desta diluição, foram realizadas diluições decimais sucessivas.

3.2.3.2. Enumeração de aeróbios psicrotróficos (Cousin et al., 2001)

Inoculou-se 0,1 mL de cada diluição na superfície de placas de Petri contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA) (Oxoid) e, usando uma alça de Drigalski, espalhou-se o inóculo por toda a superfície do meio. A seguir, incubou-se as placas a 7°C por 10 dias. Placas contendo entre 30 e 300 colônias foram contadas, a população calculada e expressa em Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g).

3.2.3.3. Enumeração de coliformes totais e fecais (Kornacki; Johnson, 2001)

Semeou-se em duplicata, 1 mL de cada diluição na superfície de placas Petrifilm™ para contagem de coliformes (3M, USA), sendo uma das placas incubadas a 37°C para determinação de coliformes totais e a outra, a 44,5°C para coliformes fecais, ambas por 24 h. Colônias típicas foram contadas em placas com até 150 colônias, a população calculada e o resultado expresso em UFC/g.

3.2.3.4. Enumeração de enterobactérias (Kornacki; Johnson, 2001)

Um mL das diluições foi semeado em profundidade em ágar vermelho violeta bile glicose (VRBG) (OXOID). Após homogenização e solidificação do meio, foi adicionada uma sobrecamada de 10 mL do mesmo meio e as placas foram incubadas a 37°C por 18 a 24 h, quando, então, as colônias típicas das placas com 30-300 colônias foram contadas, a população calculada e o resultado expresso em UFC/g.

3.2.3.5. Pesquisa de *Salmonella* sp. (Andrews et al., 2001)

Porções de 25 g da amostra foram homogeneizadas em 225 mL de caldo lactosado (Oxoid) e incubadas a 37°C por 24 h. Decorrido esse período, 0,1 mL do caldo lactosado foi transferido para 10 mL do caldo de enriquecimento Rappaport-

Vassiliadis (Oxoid) e incubado a 42°C por 24 h. Simultaneamente, foi adicionado 1 mL do caldo lactosado a 10 mL do caldo tetracionato (Oxoid CM29) e incubado a 37°C por 24 h. Após a incubação, alíquotas foram semeadas superficialmente em placas contendo ágar Hektoen Enteric (HE) (Oxoid) e ágar MLCB (Oxoid) que foram incubadas a 37°C por 24 h.

As colônias suspeitas foram inoculadas em ágar ferro lisina (LIA) e ágar tríplice açúcar ferro (TSI) (ambos Oxoid) e incubadas a 37°C por 24 h. As colônias que apresentaram resultados característicos em pelo menos um dos testes foram, posteriormente, submetidos às provas bioquímicas complementares (EPM, MILi, citrato de Simmons) (Enterokit B, Probac) e aglutinação em lâmina com soro polivalente anti-*Salmonella* (Probac, Brasil).

Figura 1. Representação esquemática das metodologias empregadas para pesquisa de *Listeria* sp. e de *Listeria monocytogenes*. PAL – ágar Palcam; OX – ágar Oxford; MOPS-BLEB (caldo tamponado para enriquecimento de *Listeria* – adicionado de MOPS); TSA-YE - ágar soja tripticaseína + extrato de levedura.

Figura 2. Representação esquemática da metodologia empregada para análise microbiológica das amostras de vegetais minimamente processados. PCA – ágar padrão para contagem; VRBG – ágar vermelho violeta bile glicose.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ocorrência de *Listeria* sp. em vegetais MP

Foram analisadas 181 amostras de vegetais MP diversos, adquiridas no comércio varejista da cidade de São Paulo, no período de março a julho de 2003.

Listeria sp. foi detectada em 4 (2,2%) das 181 amostras examinadas, empregando-se a metodologia convencional. *Listeria monocytogenes* estava presente em 1 (0,6%) amostra (espinafre), independente do método empregado. As demais

espécies encontradas foram *L. innocua* (em 2 amostras de agrião) e *L. welshimeri* (1 amostra de alface mimosa).

A ocorrência de *L. monocytogenes* nos vegetais examinados (0,6%) foi muito baixa. Dados semelhantes foram relatados por Farber et al. (1989) que, no Canadá, não detectaram *L. monocytogenes* nas 110 amostras de alface, aipo, tomate e rabanete, porém encontraram *L. ivanovii* em 1 (0,9%) amostra de rabanete.

Resultados próximos ao deste estudo também foram encontrados por Lin et al. (1996) que, nos Estados Unidos, examinaram 63 saladas de hortaliças. *L. monocytogenes* foi detectada em 1 (1,6%) amostra de salada contendo alface americana, repolho roxo, cenouras, pepinos e tomates.

Em Portugal, Guerra et al. (2001) analisaram 23 amostras de frutas e hortaliças, prontas para o consumo (incluindo brotos de soja, melancia, ervas ou saladas contendo alface, pepino, azeitona, tomate ou cenoura), e 14 de hortaliças cruas (mistura de vegetais para sopa contendo repolho, cebola, cenoura, espinafre, cogumelo fresco, e “chop-soy”), e encontraram *L. innocua* em 1 (4,3%) amostra. *L. monocytogenes* não foi detectada nas 37 amostras de vegetais examinadas.

Sagoo et al. (2003b), no Reino Unido, encontraram *Listeria* spp. em 169 (4,4%) das 3852 amostras de saladas preparadas, prontas para o consumo, e *L. monocytogenes* em 88 (2,3%) delas.

Por outro lado, os resultados deste estudo são ligeiramente inferiores aos obtidos por alguns pesquisadores. Porto, Eiroa (2001), no Brasil, analisaram 250 amostras de hortaliças diversas e encontraram *L. monocytogenes* em 3,2% das amostras (alface, salsa e agrião).

Num estudo recente, conduzido por Sagoo et al. (2003a), no Reino Unido, verificou-se que, das 2950 amostras de saladas de vegetais prontas para o consumo examinadas, *Listeria* spp. foi encontrada em 125 (4,2%) e *L. monocytogenes*, em 88 (3%) do total de amostras analisadas.

Por outro lado, alguns estudos indicam a elevada ocorrência de *Listeria* spp. em vegetais. Odumeru et al. (1997), no Canadá, analisaram 361 amostras de vegetais (sendo 65 não processadas e 296 processadas prontas para o consumo) e

constataram que *L. monocytogenes* estava presente em 18 (6,1%) amostras de vegetais processados e em 1 (1,5%) de não-processado.

Nørrung et al. (1999), na Dinamarca, examinaram no período de 1997 a 1998 350 amostras de brotos e de vegetais cortados. Do total analisado, 82 amostras (23%) apresentavam *L. monocytogenes* acima dos limites permitidos naquele país (10^2 UFC/g).

Pingulkar et al. (2001), na Índia, examinaram 128 amostras de hortaliças prontas para o consumo. *L. monocytogenes* estava presente em 6 (9,7%) das amostras de tomate e em 8 (14,8%) das 54 de vegetais diversos. Nas saladas prontas para o consumo, *L. monocytogenes* não foi isolada.

Observa-se assim que *L. monocytogenes*, ou alguma espécie de *Listeria*, pode estar presente tanto nos vegetais frescos como nos MP. Entretanto, apesar de os vegetais MP serem mais perecíveis que o produto “in natura”, pois o rompimento dos tecidos favorece a deterioração tanto de natureza química quanto microbiológica (Alzamora et al., 2000; Vilela, Henz, 2000), não se nota um maior índice de contaminação destes produtos por *L. monocytogenes*.

4.2. Avaliação da microbiota dos vegetais MP

Das 181 amostras de hortaliças MP examinadas para presença de *Listeria* spp., 133 foram submetidas à avaliação da população de alguns grupos de microrganismos. As análises realizadas foram: pesquisa de *Salmonella* sp. em 25 g, enumeração da população de coliformes totais e fecais, *Enterobacteriaceae* e microrganismos psicrotróficos aeróbios. Na Tabela 1, encontram-se os resultados obtidos.

Conforme pode ser verificado nas Tabelas 1 e 2, muitos dos vegetais examinados (68/133, 51,1% amostras) apresentaram populações expressivas ($>10^6$ UFC/g) de bactérias psicrotróficas aeróbias.

A maior parte das amostras (127, 95,5%) apresentou população de *Enterobacteriaceae* acima de 10^3 UFC/g, e em 56 amostras (42,1%) a população estava entre 10^5 - 10^6 UFC/g (Tabela 2).

Coliformes totais estavam presentes em quase todas as amostras (130/133, 97,7%) e os fecais em 97 (73%) das 133 amostras. A população de coliformes fecais foi superior a 10^2 UFC / g em todas as 97 amostras (Tabela 1), valor este estipulado pela legislação vigente (RDC Nº 12) (ANVISA).

É interessante destacar que em 27 amostras (20,3%) (Tabela 1), a população de *Enterobacteriaceae* foi inferior à observada para coliformes totais. O esperado seria encontrar populações de mesma ordem de grandeza, ou mesmo mais elevadas, no VRBG uma vez que os coliformes são parte da família *Enterobacteriaceae*.

Entretanto, esta diferença pode estar associada a uma melhor recuperação das células bacterianas quando se empregou o Petrifilm™ que com o meio VRBG. A recuperação pode ser decorrente da composição do próprio meio empregado no Petrifilm™ ou ao estresse causado pela temperatura elevada do VRBG no momento da semeadura.

Quatro amostras (3%) foram positivas para *Salmonella* sp. (amostras 59 – escarola; 60 – agrião; 66 – alface mimosa e 67 – salada fantasia) (Tabela 1). É interessante notar que duas destas amostras positivas para *Salmonella* sp. apresentaram populações de coliformes fecais $<10^2$ UFC/g (amostras 59 e 66).

Das 133 amostras analisadas, 99 (74,4%) estavam em desacordo com a RDC Nº12, que estabelece ausência de *Salmonella* sp. em 25 gramas e população máxima de coliformes a 45°C de 10^2 UFC ou NMP / g. Este é um dado preocupante, pois o consumidor, ao adquirir um produto MP, não deveria encontrá-lo em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, estando ainda sujeito a contrair uma infecção gastro-intestinal séria como a salmonelose.

São poucos os trabalhos encontrados na literatura que avaliam a qualidade microbiológica de vegetais “in natura” ou MP.

Resultados próximos ao deste estudo foram obtidos por Pingulkar et al. (2001) na Índia, que encontraram coliformes fecais em 65% dos vegetais folhosos frescos estudados. Entretanto, eles não determinaram a população deste grupo de microrganismo.

Garg et al. (1990), nos Estados Unidos, obtiveram populações entre 10^3 a 10^5 UFC/g de microrganismos psicrotróficos em amostras de alface, repolho tipo

“coleslaw”, espinafre, couve-flor e bastões de cenoura. Eles destacaram ainda que, populações elevadas de bactérias psicrotróficas em vegetais MP podem afetar negativamente a vida-de-prateleira destes alimentos refrigerados.

No estudo realizado no Reino Unido por Sagoo et al. (2003b), das 3852 amostras de saladas de vegetais prontos para o consumo analisadas detectou-se a presença de *Enterobacteriaceae* em 2919 (76%) amostras, sendo a população $\geq 10^4$ UFC/g em 1404 (37%) das amostras. *Salmonella* sp. foi isolada em 5 (0,13%) amostras.

Em outro estudo conduzido por Sagoo et al. (2003a), que avaliou a qualidade de 2950 vegetais prontos para o consumo pré-abertos, bactérias da família *Enterobacteriaceae* estavam presentes em todas as amostras, sendo a população $\geq 10^3$ UFC/g em 1638 (55,5%) amostras. Na pesquisa de *Salmonella* sp. o patógeno não foi detectado nas amostras examinadas.

Apesar de a população de *Enterobacteriaceae* encontrada neste estudo ser elevada, altos níveis de *Enterobacteriaceae* em vegetais crus são comuns e não devem ser considerados como indicadores de qualidade microbiológica. Sagoo et al. (2003a, b) afirmam que a determinação de microrganismos de origem fecal, como *E. coli*, seria melhor indicadora de contaminação.

Odumeru et al. (1997), no Canadá, avaliaram entre outras determinações, a população de organismos psicrotróficos em 9 tipos de vegetais processados e não processados (alface cortada, mistura para salada, bastões de cenoura, couve-flor, aipo fatiado, mistura para “coleslaw”, brócoli, repolho roxo e verde e pimentão verde fatiado). A população média desses microrganismos variou de 5,5 log UFC/g no brócoli a 6,9 log UFC/g nas cenouras, para produtos não-processados. Os demais tipos de vegetais avaliados, exceto o pimentão verde, apresentaram uma redução de 1 log UFC/g após seu processamento.

Dentre as fontes de contaminação dos vegetais por microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes temos o solo, água de irrigação, o emprego de esterco como fertilizante, o meio ambiente (ar) e a manipulação humana. Segundo Beuchat (1996a), as condições que influenciam a sobrevivência e multiplicação dos microrganismos também devem ser controladas na pré-colheita.

Vegetais recém-colhidos são menos suscetíveis à ação de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos. Entretanto, no produto MP pode haver multiplicação da microbiota endógena do vegetal e dos microrganismos que podem ter sido adicionados durante o processamento (Garg et al., 1990).

Apesar de a etapa de lavagem dos vegetais MP contribuir para a redução da carga microbiana, deve-se levar em consideração que as reduções variam de acordo com o grupo de microrganismo (Goularte, 2003). Além disso, os dados obtidos pelo autor indicam que para alface o processo de lavagem, sanificação e centrifugação reduziu a população de *Enterobacteriaceae* em apenas 1 ciclo logarítmico e de 0,9 a 1,2 ciclos para coliformes.

A remoção total dos microrganismos é muito difícil, principalmente porque alguns grupos de microrganismos, como por exemplo *L. monocytogenes*, têm capacidade de formar biofilmes na superfície do vegetal, o que dificulta sua remoção (Jeong, Frank 1994; Babic et al., 1997).

As saladas de vegetais folhosos MP são normalmente consumidas “in natura” e a prevenção de contaminação e/ou multiplicação bacteriana nestes produtos pode ser conseguida com a aplicação de boas práticas de higiene em toda a cadeia produtiva, desde a produção no campo até o consumidor final. A eficiência na lavagem e descontaminação, controle de temperatura durante armazenamento e distribuição, e a seleção de uma embalagem adequada também irão contribuir para a manutenção da qualidade e inocuidade destes produtos.

4.3. Avaliação do BAX[®] System para detecção de *L. monocytogenes* em vegetais MP

Conforme apresentado em 4.1, *Listeria monocytogenes* foi detectada em somente 1 amostra (0,6%, amostra espinafre), tanto pelo método convencional como pelo BAX[®] System. Entretanto, pelo método convencional 14 outras amostras apresentaram colônias suspeitas de *Listeria* nos meios de isolamento seletivo, obrigando à realização de testes bioquímicos para sua identificação. Dos 82 isolados

Tabela 1. Avaliação microbiológica das 133 amostras de vegetais folhosos minimamente processados adquiridos no comércio varejista da cidade de São Paulo.

Amostra	Determinações				
	<i>Salmonella</i> (em 25 g)	Coliformes Totais (UFC/g)	Coliformes Fecais (UFC/g)	<i>Enterobacteriaceae</i> (UFC/g)	Psicrotróficos Aeróbios (UFC/g)
1. almeirão	Ausência	3,1x10 ⁴	7,5x10 ²	2,4 x 10 ⁴	-
2. catalônia	Ausência	1,1x10 ⁶	6,5x10 ²	1,3 x 10 ⁵	5,5x10 ⁵
3. mostarda	Ausência	1,6x10 ⁶	9,7x10 ⁴	1,8 x 10 ⁵	>10 ⁸
4. espinafre	Ausência	>10 ⁸	5,4x10 ⁴	>10 ⁷	9,1x10 ⁵
5. agrião	Ausência	1,3x10 ⁶	1,1x10 ⁴	>10 ⁷	3,4x10 ⁵
6. agrião	Ausência	2,2x10 ⁶	7,2x10 ³	2,5 x 10 ⁵	6,4x10 ⁵
7. espinafre	Ausência	9,0x10 ⁴	<10	9,2 x 10 ⁴	6,2x10 ⁵
8. rúcula	Ausência	1,5x10 ⁵	2,3x10 ²	>10 ⁷	8,4x10 ⁵
9. rúcula	Ausência	8,4x10 ³	5,8x10 ²	7,7 x 10 ³	3,3x10 ⁵
10. rúcula	Ausência	1,3x10 ⁶	6,3x10 ⁴	>10 ⁷	5,6x10 ⁵
11. escarola	Ausência	4,6x10 ⁴	1,1x10 ³	3,9 x 10 ⁴	4,4x10 ⁵
12. escarola	Ausência	1,4x10 ⁵	1,2x10 ³	4,8 x 10 ⁴	5,4x10 ⁴
13. acelga	Ausência	7,0x10 ²	<10	9,0 x 10 ²	1,6x10 ⁵
14. mixed salad ^a	Ausência	1,2x10 ⁶	6,2x10 ⁴	>10 ⁷	>10 ⁸
15. garden salad ^b	Ausência	1,0x10 ⁶	3,8x10 ²	>10 ⁷	>10 ⁸
16. alface crespa	Ausência	7,6x10 ⁵	2,8x10 ²	1,8 x 10 ⁵	-
17. alface crespa	Ausência	7,4x10 ⁴	<10	3,7 x 10 ³	2,2x10 ⁵
18. alface crespa	Ausência	1,3x10 ⁶	6,4x10 ²	1,7 x 10 ⁵	4,7x10 ⁴
19. alface mimosa	Ausência	1,2x10 ⁶	7,3x10 ²	1,4 x 10 ⁵	7,9x10 ⁵
20. alface americana	Ausência	6,7x10 ⁴	6,5x10 ²	1,3 x 10 ⁴	8,0x10 ¹
21. alface americana	Ausência	1,0x10 ⁶	<10	1,3 x 10 ⁵	1,4x10 ⁶
22. alface americana	Ausência	2,0x10 ⁴	3,0x10 ¹	5,3 x 10 ³	6,1x10 ⁵
23. alface lisa	Ausência	3,5x10 ⁴	<10	1,7 x 10 ⁴	4,6x10 ⁵
24. alface lisa	Ausência	8,8x10 ⁴	1,0x10 ⁴	8,2 x 10 ⁴	2,4x10 ⁴

cont.

^amixed salad (alface, escarola, agrião, rúcula, frisée, radicchio)

^bgarden salad (alface americana, rúcula, radicchio)

cont. Tab.1

Amostra	Determinações				
	<i>Salmonella</i> (em 25 g)	Coliformes Totais (UFC/g)	Coliformes Fecais (UFC/g)	<i>Enterobacteriaceae</i> (UFC/g)	Psicrotróficos Aeróbios (UFC/g)
25. espinafre	Ausência	3,3x10 ⁵	6,0x10 ³	5,4x10 ⁵	5,4x10 ⁵
26. master espinafre	Ausência	5,7x10 ³	<10 ²	5,3x10 ³	9,0x10 ³
27. espinafre	Ausência	3,3x10 ⁴	<10 ²	8,9x10 ³	1,0x10 ⁴
28. escarola	Ausência	6,8x10 ⁵	4,0x10 ²	2,4x10 ⁵	2,1x10 ⁶
29. escarola / chicória	Ausência	2,2x10 ⁵	4,6x10 ³	1,8x10 ⁵	2,4x10 ⁵
30. escarola	Ausência	4,4x10 ³	4,0x10 ²	2,8x10 ⁴	6,8x10 ⁴
31. rúcula	Ausência	4,0x10 ⁵	5,7x10 ⁴	3,0x10 ⁵	2,1x10 ⁵
32. rúcula	Ausência	4,7x10 ⁵	2,3x10 ⁴	4,2x10 ⁵	6,0x10 ⁶
33. almeirão	Ausência	8,9x10 ⁴	7,2x10 ³	9,5x10 ⁴	7,5x10 ⁴
34. almeirão	Ausência	7,6x10 ⁵	2,0x10 ³	2,3x10 ⁵	3,8x10 ⁵
35. alface lisa	Ausência	4,3x10 ⁵	3,0x10 ³	5,2x10 ⁵	5,4x10 ⁴
36. alface lisa	Ausência	<10 ²	<10 ²	1,0x10 ¹	<10
37. alface lisa	Ausência	6,2x10 ⁵	1,0x10 ⁴	1,3x10 ⁵	3,3x10 ⁵
38. alface crespa	Ausência	6,3x10 ⁵	8,6x10 ⁴	6,7x10 ⁵	2,4x10 ⁶
39. salada do chef ^c	Ausência	3,1x10 ⁵	1,4x10 ³	2,1x10 ⁵	7,2x10 ⁵
40. alface mimosa	Ausência	6,6x10 ⁵	1,7x10 ³	6,7x10 ⁵	5,4x10 ⁶
41. mesclan ^d	Ausência	2,9x10 ⁵	3,5x10 ³	3,4x10 ⁵	1,3x10 ⁶
42. caesar salad ^e	Ausência	5,8x10 ⁵	2,4x10 ³	6,8x10 ⁵	8,8x10 ⁶
43. catalônia	Ausência	4,6x10 ⁵	9,7x10 ³	3,3x10 ⁵	8,1x10 ⁵
44. agrião	Ausência	2,8x10 ⁵	4,8x10 ³	5,4x10 ⁵	6,8x10 ⁵
45. agrião	Ausência	9,2x10 ⁶	8,4x10 ⁴	5,3x10 ⁵	2,6x10 ⁶
46. alface americana	Ausência	7,0x10 ⁵	4,6x10 ⁴	7,2x10 ⁵	1,3x10 ⁶
47. alface americana	Ausência	6,3x10 ⁴	1,5x10 ³	3,0x10 ⁴	1,0x10 ⁵
48. alface americana	Ausência	3,3x10 ³	<10 ²	1,9x10 ³	7,3x10 ³
49. espinafre	Ausência	1,7x10 ³	<10 ²	1,3x10 ³	3,5x10 ³
50. almeirão	Ausência	1,5x10 ³	<10 ²	2,3x10 ²	5,0x10 ⁴

cont.

^csalada do chef (alface americana, alface crespa roxa, agrião)

^dmesclan (alface, agrião, radicchio, escarola)

^ecaesar salad (alface romana com queijo parmesão, croutons e molho)

cont. Tab.1

Amostra	Determinações				
	<i>Salmonella</i> (em 25 g)	Coliformes Totais (UFC/g)	Coliformes Fecais (UFC/g)	<i>Enterobacteriaceae</i> (UFC/g)	Psicrotróficos Aeróbios (UFC/g)
51. espinafre	Ausência	1,4x10 ⁷	3,0x10 ⁴	2,2x10 ⁶	3,7x10 ⁶
52. couve	Ausência	1,0x10 ⁷	6,4x10 ⁴	1,3x10 ⁶	2,7x10 ⁶
53. couve manteiga fatiada	Ausência	9,2x10 ⁶	2,9x10 ⁴	1,4x10 ⁶	2,3x10 ⁶
54. catalônia	Ausência	6,3x10 ³	<10 ²	2,2x10 ³	6,5x10 ³
55. repolho roxo fatiado	Ausência	4,9x10 ⁵	<10 ²	1,7x10 ⁵	2,4x10 ⁵
56. repolho branco fatiado	Ausência	8,0x10 ⁴	3,4x10 ³	7,5x10 ⁴	1,1x10 ⁵
57. brócolis	Ausência	9,4x10 ⁶	2,0x10 ³	1,1x10 ⁶	4,8x10 ⁶
58. brócolis ninja	Ausência	3,0x10 ³	<10 ²	1,2x10 ³	2,8x10 ³
59. escarola	Presença	2,2x10 ⁴	<10 ²	5,2x10 ³	5,0x10 ⁵
60. agrião	Presença	3,6x10 ⁵	1,5x10 ³	6,5x10 ⁴	2,2x10 ⁶
61. acelga	Ausência	<10 ²	<10 ²	2,6x10 ²	5,9x10 ⁴
62. alface lisa	Ausência	9,7x10 ³	<10 ²	3,5x10 ³	5,9x10 ⁴
63. alface crespa	Ausência	4,6x10 ⁵	<10 ²	1,7x10 ⁵	1,2x10 ⁶
64. alface crespa	Ausência	7,4x10 ⁵	6,0x10 ³	1,4x10 ⁵	7,1x10 ⁵
65. alface crespa	Ausência	2,7x10 ³	<10 ²	1,2x10 ³	3,7x10 ³
66. alface mimosa	Presença	6,6x10 ⁴	<10 ²	1,5x10 ⁴	5,0x10 ⁵
67. salada fantasia ^f	Presença	>10 ⁸	9,3x10 ⁴	>10 ⁷	1,2x10 ⁶
68. alface americana	Ausência	9,2x10 ³	<10 ²	2,6x10 ³	7,2x10 ³
69. alface americana	Ausência	2,8x10 ⁵	1,4x10 ³	9,1x10 ⁴	7,5x10 ⁵
70. salsão	Ausência	1,1x10 ⁷	6,2x10 ⁴	1,3x10 ⁶	1,3x10 ⁶
71. catalônia	Ausência	3,4x10 ⁵	1,1x10 ³	2,7x10 ⁵	9,0x10 ⁶
72. agrião	Ausência	3,1x10 ⁴	-	2,4x10 ⁴	9,0x10 ⁵
73. alface lisa	Ausência	6,3x10 ⁴	8,0x10 ²	2,6x10 ⁴	1,1x10 ⁶
74. espinafre	Ausência	5,2x10 ⁶	4,2x10 ⁴	4,0x10 ⁶	6,9x10 ⁶
75. alface crespa	Ausência	2,6x10 ⁵	<10 ²	1,2x10 ⁵	3,6x10 ⁶
76. rúcula	Ausência	8,6x10 ⁵	4,8x10 ³	1,3x10 ⁶	1,7x10 ⁷
77. alface roxa	Ausência	2,4x10 ⁵	9,0x10 ²	1,5x10 ⁴	3,1x10 ⁶
78. escarola	Ausência	6,9x10 ⁴	5,0x10 ²	5,2x10 ⁴	1,4x10 ⁶
79. almeirão	Ausência	3,1x10 ⁵	9,0x10 ²	2,0x10 ⁵	5,4x10 ⁶
80. salada ticiano ^g	Ausência	6,8x10 ⁵	2,6x10 ³	5,2x10 ⁵	1,3x10 ⁷

cont.

^fsalada fantasia (beterraba, cenoura, alface, almeirão, repolho)

^gsalada ticiano (alface crespa, alface americana, alface roxa)

cont. Tab.1

Amostra	Determinações				
	<i>Salmonella</i> (em 25 g)	Coliformes Totais (UFC/g)	Coliformes Fecais (UFC/g)	<i>Enterobacteriaceae</i> (UFC/g)	Psicrotróficos Aeróbios (UFC/g)
81. acelga	Ausência	5,4x10 ⁵	1,1x10 ³	3,9x10 ⁵	6,9x10 ⁶
82. salada romana	Ausência	7,0x10 ⁴	4,0x10 ²	9,8x10 ⁴	3,4x10 ⁶
83. french salad ^h	Ausência	3,1x10 ⁵	<10 ²	3,6x10 ⁵	3,0x10 ⁶
84. escarola	Ausência	7,5x10 ⁴	1,0x10 ³	4,9x10 ⁴	2,5x10 ⁶
85. radicchio	Ausência	3,4x10 ⁴	9,0x10 ²	3,4x10 ⁴	4,1x10 ⁵
86. coração de alface americana	Ausência	6,4x10 ⁵	3,8x10 ⁴	4,6x10 ⁵	7,2x10 ⁵
87. alface americana	Ausência	5,4x10 ³	<10 ²	9,0x10 ³	1,7x10 ⁴
88. agrião	Ausência	6,4x10 ⁵	2,4x10 ⁴	4,3x10 ⁵	4,6x10 ⁶
89. rúcula	Ausência	2,8x10 ⁵	1,0x10 ⁴	1,5x10 ⁵	2,0x10 ⁶
90. salada da terra ⁱ	Ausência	3,0x10 ⁴	9,0x10 ²	1,2x10 ⁴	1,3x10 ⁵
91. alface crespa	Ausência	2,4x10 ⁵	2,4x10 ³	1,3x10 ⁵	2,0x10 ⁶
92. alface americana	Ausência	5,4x10 ⁶	7,7x10 ³	9,8x10 ⁵	3,2x10 ⁶
93. rúcula	Ausência	3,6x10 ⁵	4,7x10 ⁴	1,2x10 ⁵	4,5x10 ⁶
94. agrião	Ausência	>10 ⁸	5,3x10 ⁴	>10 ⁷	8,5x10 ⁶
95. salada tricolor ^j	Ausência	1,6x10 ⁴	8,0x10 ²	1,0x10 ⁴	3,3x10 ⁵
96. espinafre	Ausência	1,0x10 ⁶	1,2x10 ³	1,3x10 ⁶	2,4x10 ⁶
97. alface americana	Ausência	>10 ⁸	7,3x10 ³	7,4x10 ⁵	2,9x10 ⁶
98. mini salada prática	Ausência	6,5x10 ⁴	<10 ²	5,8x10 ⁴	8,6x10 ⁷
99. alface crespa	Ausência	5,2x10 ⁵	6,2x10 ⁴	2,8x10 ⁵	3,0x10 ⁵
100. escarola	Ausência	2,4x10 ³	<10 ²	2,3x10 ⁵	1,8x10 ⁴
101. rúcula	Ausência	2,5x10 ⁵	7,2x10 ⁴	1,2x10 ⁵	4,8x10 ⁶
102. agrião	Ausência	3,8x10 ⁶	1,8x10 ⁴	5,9x10 ⁵	1,6x10 ⁶
103. espinafre	Ausência	8,0x10 ⁵	3,5x10 ⁴	5,0x10 ⁵	1,8x10 ⁶
104. garden salad ^l	Ausência	>10 ⁸	3,2x10 ⁴	>10 ⁷	3,1x10 ⁶
105. mixed salad ^a	Ausência	8,4x10 ⁴	5,1x10 ³	4,8x10 ⁴	1,6x10 ⁶
106. caesar salad ^e	Ausência	6,0x10 ⁵	7,0x10 ⁴	6,9x10 ⁴	6,3x10 ⁶
107. salada paulista	Ausência	6,8x10 ⁵	1,1x10 ⁵	1,5x10 ⁶	3,6x10 ⁶

cont.

^amixed salad (alface, escarola, agrião, rúcula, frisée, radicchio)

^ecaesar salad (alface romana com queijo parmesão, croutons e molho)

^hfrench salad (alface americana, roxa e crespa, agrião)

ⁱsalada da terra (alface americana, crespa, verde e roxa)

^jsalada tricolor (alface, rúcula, radicchio, endívia, frisée)

^lgarden salad (alface americana, crespa, radicchio, cenoura)

cont. Tab.1

Amostra	Determinações				
	<i>Salmonella</i> (em 25 g)	Coliformes Totais (UFC/g)	Coliformes Fecais (UFC/g)	<i>Enterobacteriaceae</i> (UFC/g)	Psicrotróficos Aeróbios (UFC/g)
108. coração de alface americana	Ausência	2,8x10 ⁵	5,3x10 ⁴	2,4x10 ⁵	1,4x10 ⁶
109. salada italiana	Ausência	6,3x10 ⁴	5,5x10 ³	6,4x10 ⁴	1,6x10 ⁶
110. rúcula	Ausência	8,9x10 ⁵	2,5x10 ⁴	8,2x10 ⁵	3,4x10 ⁶
111. agrião	Ausência	6,3x10 ⁴	1,7x10 ³	3,0x10 ⁴	9,0x10 ⁵
112. alface americana	Ausência	1,6x10 ³	<10 ²	7,9x10 ²	1,3x10 ⁵
113. escarola	Ausência	5,8x10 ³	<10 ²	6,6x10 ³	5,6x10 ⁴
114. rúcula	Ausência	1,3x10 ⁵	<10 ²	3,9x10 ⁵	6,0x10 ⁶
115. salada mista	Ausência	3,1x10 ⁵	1,8x10 ³	8,3x10 ⁴	1,6x10 ⁶
116. alface crespa	Ausência	1,3x10 ⁵	<10 ²	2,0x10 ⁵	1,8x10 ⁷
117. agrião	Ausência	6,6x10 ⁴	<10 ²	2,3x10 ⁴	7,4x10 ⁵
118. espinafre	Ausência	2,6x10 ⁵	<10 ²	2,5x10 ⁴	3,3x10 ⁶
119. salada da semana ^m	Ausência	5,2x10 ⁶	1,2x10 ⁵	2,4x10 ⁶	9,9x10 ⁶
120. agrião	Ausência	3,0x10 ⁵	1,3x10 ⁴	2,4x10 ⁵	1,2x10 ⁶
121. espinafre	Ausência	3,6x10 ⁵	3,8x10 ⁴	4,9x10 ⁴	4,9x10 ⁵
122. catalônia	Ausência	5,8x10 ⁵	1,6x10 ⁴	4,6x10 ⁵	1,6x10 ⁶
123. alface crespa	Ausência	9,0x10 ⁵	2,3x10 ⁴	2,3x10 ⁵	2,5x10 ⁶
124. agrião	Ausência	>10 ⁸	6,0x10 ⁶	>10 ⁷	>10 ⁸
125. rúcula	Ausência	5,2x10 ⁴	<10 ²	1,2x10 ⁴	>10 ⁸
126. alface americana	Ausência	>10 ⁸	7,7x10 ⁵	9,6x10 ⁵	1,4x10 ⁷
127. salada italiana ⁿ	Ausência	6,9x10 ⁵	1,5x10 ³	1,2x10 ⁵	5,8x10 ⁶
128. salada tropical ^o	Ausência	5,0x10 ⁶	8,1x10 ³	1,1x10 ⁶	1,1x10 ⁷
129. alface crespa	Ausência	<10 ²	<10 ²	3,3x10 ²	1,4x10 ⁴
130. alface americana	Ausência	1,8x10 ⁴	<10 ²	1,6x10 ⁴	6,2x10 ⁴
131. alface americana	Ausência	8,6x10 ⁵	5,1x10 ³	7,4x10 ⁵	7,6x10 ⁶
132. escarola	Ausência	4,2x10 ⁶	2,3x10 ⁴	1,4x10 ⁶	1,2x10 ⁷
133. repolho branco fatiado	Ausência	1,7x10 ⁵	2,5x10 ³	2,5x10 ⁵	1,2x10 ⁶

^msalada da semana (repolho roxo, alface romana, alface crespa verde, cenoura)

ⁿsalada italiana (alface americana, escarola, frisée, radicchio)

^osalada tropical (alface americana, repolho roxo, cenoura)

Tabela 2. Distribuição das amostras de vegetais MP de acordo com as populações de coliformes totais e fecais, *Enterobacteriaceae* e microrganismos psicrotróficos aeróbios.

População (UFC/g)	Nº de amostras			
	Coliformes Totais	Coliformes Fecais	<i>Enterobacteriaceae</i>	Psicrotróficos Aeróbios
0 - 10	3	36	1	3
10 - 10 ²	0	1	0	1
10 ² - 10 ³	1	19	5	0
10 ³ - 10 ⁴	15	38	15	7
10 ⁴ - 10 ⁵	29	35	34	15
10 ⁵ - 10 ⁶	57	3	56	39
>10 ⁶	28	1	22	68

submetidos à especiação, somente 6, provenientes da amostra de espinafre, foram identificados como *L. monocytogenes*.

Com o emprego dos testes bioquímicos convencionais, leva-se até 7 dias para a confirmação da espécie, o que obriga a retenção de lotes de produto por tempo prolongado.

A busca por métodos sensíveis e de execução mais rápida tem levado as empresas ao desenvolvimento de um grande número de métodos para a pesquisa de patógenos em alimentos. Dentre estes métodos, aqueles que empregam ferramentas moleculares têm se tornado mais populares, cabendo destacar os que empregam a reação de polimerização em cadeia (PCR).

Para a pesquisa de *L. monocytogenes*, existe no mercado o sistema automatizado BAX[®]System que permite a detecção de *L. monocytogenes* em até 54 h. Este sistema é de fácil utilização, porque todos os reagentes necessários para a PCR vêm na forma peletizada, evitando, assim, erros de manipulação. Com o emprego do BAX[®]System, não se obtiveram, neste estudo, resultados positivos ou negativos falsos, tendo ocorrido 100% de concordância entre os métodos avaliados.

Na detecção de *L. monocytogenes* da amostra positiva (espinafre) pelo método BAX[®], verificou-se que a curva de fusão (“melting curve”) estava dentro da faixa de detecção específica para o organismo testado (83,5 a 86°C), indicando ser realmente o microrganismo em questão (Anexos 1 e 2). Nas amostras negativas, não se verificou a presença de picos na faixa de temperatura anteriormente citada, existindo apenas o pico referente ao controle interno (78 a 80°C) (Anexos 1 e 3).

A elevada sensibilidade e especificidade do BAX[®] observada neste estudo deve ser decorrente da especificidade dos primers e do programa de amplificação utilizados. Segundo Zhang et al. (2004), o sistema BAX[®] *L. monocytogenes* não amplifica seqüências da região genômica de outras espécies de *Listeria*, nem reage com outras espécies de bactérias, incluindo *Bacillus cereus*, *Brochotrix* spp., *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Um estudo realizado pela DuPont demonstrou que, com o BAX[®]System, foi possível detectar a presença de 190 cepas diferentes de *L. monocytogenes* e que

nenhuma das 50 cepas de outras espécies do gênero e cepas de 20 outros gêneros foram detectadas (User's Guide, 2000).

São poucos os relatos de pesquisas, na literatura, sobre a avaliação deste sistema para pesquisa de *Listeria* sp. ou *L. monocytogenes* comparando seu desempenho com o do método convencional. Por esta razão, também serão apresentados aqui os resultados disponíveis de estudo feitos com o sistema BAX[®] para outros microrganismos, como por exemplo, *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* O157:H7.

Deve-se, ainda, levar em consideração que os trabalhos publicados de 1998 até o início de 2003 foram realizados com o sistema BAX[®] "manual", onde a detecção dos produtos de amplificação era realizada por eletroforese em gel de agarose.

O trabalho pioneiro de avaliação do sistema BAX[®] manual foi publicado por Stewart, Gendel (1998) nos Estados Unidos. Estes autores avaliaram a especificidade e sensibilidade do sistema, empregando culturas puras e culturas mistas, e verificaram que o sistema se mostrou adequado para avaliação e monitoramento microbiológico de rotina.

Naquele mesmo ano, Bailey comparou a eficiência do Sistema BAX[®] *Salmonella* manual com o do método convencional (U.S.F.S.I.S. modificado) e observou que o sistema BAX[®] permitiu a detecção de *Salmonella* com mais frequência do que a metodologia convencional. Das 150 amostras de aves e 50 de carne moída de peru, naturalmente contaminadas, *Salmonella* sp. foi detectada com o BAX[®] em 26% e com o método convencional, em 22% das amostras (Bailey, 1998).

Norton et al. (2000), nos Estados Unidos, comparando o desempenho do BAX[®] *Listeria* com o da metodologia convencional (U.S.F.D.A. modificado) para a pesquisa de *Listeria* em amostras de peixe defumado e do ambiente de processamento, verificaram que a sensibilidade do BAX[®] foi de 89,9%. Como este estudo foi realizado com o BAX[®] manual e não havia a padronização dos caldos de enriquecimento, os autores atribuíram a baixa sensibilidade à pouca eficiência do caldo de enriquecimento utilizado.

Num estudo de avaliação do desempenho do BAX[®] *L. monocytogenes*, Hochberg et al. (2001) analisaram 16 tipos de alimentos artificialmente contaminados, empregando também o método ISO. Eles verificaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os 2 métodos e que o BAX[®] permitiu a detecção em 100% das amostras.

Hoffman, Wiedmann (2001), nos Estados Unidos, avaliaram a presença do gênero *Listeria* em amostras ambientais e de *L. monocytogenes* em amostras de peixes de 2 plantas processadoras, empregando um método convencional (U.S.F.D.A. modificado) e o BAX[®]. Os autores verificaram que o BAX[®] *L. monocytogenes* apresentou sensibilidade de 94,7% e especificidade de 97,4%. Eles concluíram que apesar dos resultados obtidos com o BAX[®] serem disponibilizados em 3 dias, deve-se levar em consideração a necessidade de equipamentos específicos, e de obtenção dos isolados para estudos futuros.

Um estudo realizado por Shearer et al. (2001) avaliou a sensibilidade dos métodos BAX[®] e o convencional (U.S.F.D.A.) para detecção de *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria* sp. e *L. monocytogenes*, inoculados artificialmente em amostras de frutas e vegetais. Os autores constataram que o BAX[®] foi tão sensível quanto o método convencional na detecção de *Salmonella* Enteritidis, *Listeria* sp. e *L. monocytogenes*, e mais sensível do que o convencional para detecção de *E. coli* O157:H7. Quando as amostras foram contaminadas com populações baixas (<10 UFC / 25 g), a detecção dos patógenos foi possível somente em alguns tipos de amostras, indicando a influência do tipo de amostra no resultado.

De acordo com Norton (2002), a escolha do enriquecimento a ser utilizado não influencia o desempenho do Sistema BAX[®], uma vez que este foi idealizado para permitir flexibilidade de uso. Segundo este autor, com o emprego do enriquecimento adequado à matriz alimentícia em estudo, populações de *L. monocytogenes* tão baixas como 1 UFC / 25 g de alimento podem ser detectadas com o BAX[®].

No Brasil, Rodrigues et al. (2002) avaliaram o método BAX[™], não automatizado, para detecção de *L. monocytogenes* em 413 amostras de uma planta produtora de nuggets de frango. O método apresentou alta especificidade (96,9%) para *L. monocytogenes* com baixo número de falso-positivos (5 amostras). Contudo, o número

de falso-negativos foi muito alto (111 amostras). A eficiência foi baixa (71,6%), enquanto a sensibilidade foi fraca (55,1%). Foi verificado, ainda, que o tipo de amostra influenciou o resultado obtido com o sistema.

Um total de 206 amostras de brotos de alfafa e 202 amostras de cogumelos, natural e artificialmente contaminados, foi avaliado pelo método molecular BAX[®] “manual” quanto à presença de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria* sp. e *L. monocytogenes*, nos Estados Unidos, por Strapp et al. (2003). Um total de 17 (8,4%) amostras de cogumelos, naturalmente contaminadas, foi positivo para *Listeria* sp. empregando-se o BAX[®] *Listeria*. Entretanto, *L. monocytogenes* não foi detectada. As amostras positivas obtidas com o BAX[®] foram submetidas à especiação, utilizando técnicas bioquímicas convencionais, isolando-se *L. welshimeri* em 2 amostras, *L. innocua*, em 12, e *Listeria* sp. não foi isolada de 3 amostras. Para as amostras de brotos de alfafa, *Listeria* sp. foi detectada em 8 (3,9%) amostras e *L. monocytogenes* em 1 (0,5%). *L. seeligeri* foi identificada, pelo método convencional, em 2 amostras, enquanto *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* em 1 (0,5%) amostra de cada.

Bailey, Cosby (2003), nos Estados Unidos, realizaram um estudo com 183 amostras de água de enxágüe de carcaças de frangos e 90 amostras de salsichas de frango, para detectar a presença de *Salmonella*, natural e artificialmente contaminada, utilizando o método convencional (USDA) e o BAX[®]System automatizado. O método convencional apresentou 184 amostras como *Salmonella* positivas, enquanto o BAX[®]System 192 do total examinado. Eles verificaram, ainda, que com o sistema BAX[®] obtiveram 9 resultados tecnicamente falso-positivos para as salsichas. No entanto, quando analisaram as curvas de fusão (“melting curve”) concluíram que, possivelmente, estas amostras foram positivas para *Salmonella* e que o método convencional falhou na sua detecção. O percentual de concordância entre os métodos foi de 99,1% para o enxágüe de carcaças e de 88,6% para as salsichas.

Num estudo recente multi-laboratorial de avaliação do desempenho do BAX[®] *L. monocytogenes*, conduzido por Silbernagel et al. (2004), foram analisados 6 tipos diferentes de alimentos de origem vegetal e animal e 2 níveis de inóculos (0,2 UFC / g; 2 UFC / g). Das 2335 amostras analisadas, 1109 foram positivas pelo sistema BAX[®] e 1115 pelo método convencional. Os resultados das análises estatísticas (χ^2)

demonstraram que, em todos os alimentos testados, exceto rabanete, o sistema automatizado BAX[®] apresentou o mesmo ou melhor desempenho que o método convencional (AOAC, FDA ou USDA, dependendo da amostra).

A avaliação do desempenho do sistema BAX[®] *Salmonella* também foi realizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil, no LANAL-microbiologia (Brasil, 2004). Numa primeira fase, empregando uma matriz à base de carne e utilizando altas e baixas concentrações de células de *Salmonella* sp., obtiveram concordância de 95% com o método de referência. A sensibilidade foi de 98% e a especificidade de 95%. Na segunda etapa, 70 tipos de produtos foram simultaneamente examinados em 4 laboratórios (1879 amostras), e 52 foram positivas para *Salmonella*, tanto pelo método convencional quanto pelo BAX[®]. A sensibilidade foi de 98,1%, a especificidade e a precisão relativa foram de 98,5% (Brasil, 2004).

Pode-se perceber que, em todos os testes de avaliação realizados, tanto para o BAX[®] manual quanto o automatizado, os resultados sempre foram satisfatórios, apresentando sensibilidade igual ou melhor do que o convencional.

O sistema BAX[®] foi colocado no mercado em novembro de 2000 e o USDA-FSIS aprovou-o como método para detectar *L. monocytogenes* em produtos cárneos em 2002 (FSIS, 2002). No Brasil, o MAPA, conforme Instrução Normativa nº 41, de 7 de julho de 2004 (Brasil, 2004), aprovou o sistema, como método oficial, para a detecção de *Salmonella* sp. em amostras de alimentos, água e amostras de “swabs” ambientais. Porém, para *L. monocytogenes* ainda não há informação.

Testes simples, que permitissem a obtenção de resultados confiáveis, que fossem precisos, de baixo custo, de execução simples e que possibilitassem a quantificação do patógeno diretamente no alimento, seriam de grande valia. Entretanto, até o momento, nenhum dos testes comercialmente disponíveis reúne todas estas características.

Os métodos atualmente comercializados que são específicos para *L. monocytogenes* apresentam vantagens em relação aos que são gênero-específicos. O argumento mais óbvio para isso é baseado no fato de que, potencialmente, todos os casos de listeriose humana são causados unicamente por *L. monocytogenes*. A

presença em alimentos de outras espécies do gênero não indica risco potencial à saúde. Desta forma, estes testes espécie-específicos poderiam garantir uma maior segurança e uma menor perda financeira para as empresas produtoras de alimentos.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e na discussão apresentada, pode-se concluir que:

1. A presença de *Salmonella* sp. em vegetais MP indica potencial risco à saúde do consumidor.
2. O processamento industrial de vegetais MP pelas diferentes empresas não está levando a produtos de boa qualidade microbiológica.
3. *Listeria monocytogenes* não parece ser um patógeno de importância nos vegetais MP examinados.
4. O sistema BAX[®] é de fácil execução, rápido e apresenta desempenho comparável ao do método convencional, independente da amostra examinada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZAMORA, S.M.; LÓPEZ-MALO, A.; TAPIA, M.S. Overview. In: ALZAMORA, S.M.; TAPIA, M.S.; LÓPEZ-MALO, A., eds. **Minimally processed fruits and vegetables**: fundamental aspects and applications. Gaithersburg: Aspen, 2000. p.1-9.

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: APHA, 2001. p.357-380.

De acordo com a NBR6023/2002 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 2003.

- AOAC INTERNATIONAL (AOAC). *Listeria monocytogenes* – Chapter 15: In **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 16th. ed., PA Cunniff, p. 94a-98. AOAC International, Gaithersburg, MD, 993.12, 1999. Disponível em: <http://seafood.ucdavis.edu/HACCP/Compendium/Chapt15.htm>. Acesso em: 30 abr. 2004.
- ARUMUGASWAMY, R.K.; ALI, G.R.R.; HAMID, S.N.B.A. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods in Malaysia. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.23, p.117-121, 1994.
- AURELI, P.; FIORUCCI, G.C.; CAROLI, D.; MARCHIARO, G.; NOVARA, O.; LEONE, L.; SALMSAO, S. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v.342, p.1236-1241, 2000.
- BABIC, I.; WATADA, A.E.; BUTA, J.G. Growth of *Listeria monocytogenes* restricted by native microorganisms and other properties of fresh-cut spinach. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.60, n.8, p.912-917, 1997.
- BAILEY, J.S. Detection of *Salmonella* cells within 24 to 26 hours in poultry samples with the polymerase chain reaction BAX[®]System. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.61, n.7, p.792-795, 1998.
- BAILEY, J.S.; COSBY, D.E. Detection of *Salmonella* from chicken rinses and chicken hot dogs with the automated BAX[®] PCR system. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.66, n.11, p.2138-2140, 2003.
- BARBUTI, S.; MERCADANTI, I.; MUTTI, P.; QUINTAVALLA, S. Deteminazione rapida di *Listeria monocytogenes* in prodotti carnei: valutazione del metodo Gene-track[®]. **Ind. Cons.**, Parma, v.75, p.3-11, 2000.

- BENNIK, M.H.J.; PEPPELENBOS, H.W.; NGUYEN-THE, C.; CARLIN, F.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M. Microbiology of minimally processed, modified-atmosphere packaged chicory endive. **Postharvest Biol. Technol.**, Amsterdam, v.9, n.2, p.209-221, 1996.
- BEUCHAT, L.R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.59, n.2, p.204-216, 1996a.
- BEUCHAT, L.R. *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. **Food Control**, Letchworth, v.7, n.4/5, p.223-228, 1996b.
- BEUCHAT, L.R.; BRAKETT, R. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging and temperature. **J. Food Sci.** v.55, n.3., p.755-758, 1990.
- BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E.; HAO, D.Y.Y.; CONNER, D.E. Growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in cabbage and cabbage juice. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v.32, p.791, 1986.
- BLENDEN, D.C.; SZATALOWICZ, F.T. Ecological aspects of listeriosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.151, p.1761, 1967.
- BRACKETT, R.E. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in products of plant origin. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p.631-655.
- BRACKETT, R.E. Fruits, Vegetables, and Grains. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J., eds. **Food microbiology fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 2001. p.127-138.

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: APHA, 2001. p.515-520.

BRASIL. Instrução Normativa nº41, de 7 de junho de 2004. Validação da metodologia utilizada pelo sistema de detecção patogênica para alimentos e amostras ambientais – A.BAX[®] para detecção de *Salmonella* spp. em amostras de alimentos, água e amostras ambientais (swab), como método alternativo equivalente ao método de referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Diário Oficial da União**, Brasília, n.113, 15 jun. 04. Seção 1, p.3-6. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/LEGISLACAO/PUBLICACOES_DOU/PUBLICACOES_DOU_2004/PUBLICACOES_DOU_JUNHO_2004/D01_15.06.2004-MAPA53682.PDF. Acesso em: 7 Jun. 2004.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Multistate outbreak of listeriosis – United States**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/od/oc/media/pressrel/r990114.htm>. Acesso em: 17 mar. 1999.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Preliminary FoodNet Data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – selected sites – United States**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/epo/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5316a2.htm>. Acesso em: 30 abr. 2004.

COUSIN, M.A.; JAY, J.M.; VASSAVADA, P.C. Psychrotopic microorganisms. In: DOWLES, F.P., ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: APHA, 2001. p.159-166.

DIAZ, R.; GUEVARA, L.M.; ROJAS, B. Incidência de *Listeria* spp. em ensaladas de vegetais com mínimo processamento empacadas em bolsas de polipropileno. In:

- CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5, Águas de Lindóia, 1998. **Livro de Resumos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1998. r.P.Q.1.3., p.99.
- DONNELLY, C.W. Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p.225-260.
- DUFFY, G.; CLOAK, O.M.; SHERIDAN, J.J.; BLAIR, I.S.; McDOWELL, D.A. The development of a combined surface adhesion and polymerase chain reaction technique in the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.49, p.151-159, 1999.
- FARBER, J.M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.59, n.10, p.1091-1101, 1996.
- FARBER, J.M.; COATES, F.; DALEY, E. Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.15, p.103-105, 1992.
- FARBER, J.M.; SANDERS, G.W.; JOHNSTON, M.A. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.52, n.7, p.456-458, 1989.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods**. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/lmr2-2.html#Listeriosis>. Acesso em: 21 set. 2003.

FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. **FSIS adopts new screening method for *Listeria monocytogenes***. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/Ao/news/2002/bax.htm>. Acesso em: 30 abr. 2002.

FRANCO, B.D.G.M. **Métodos rápidos de análise microbiológica de alimentos: estudo crítico e avaliação de novas metodologias**. São Paulo; 1994. 128p. Tese de Livre-Docência - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

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

GARG, N.; CHUREY, J.J.; SPITTSTOESSER, D.F. Effect of conditions on the Microflora of fresh-cut vegetables. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.53, n.8, p.701-703, 1990.

GOUIN, E.; MENGAUD, J.; COSSART, P. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. **Infect. Immun.**, Washington, v.62, p.3550-3553, 1994.

GOULARTE, L. **Aplicação de processos combinados – processamento mínimo e radiação ionizante (⁶⁰Co) – visando o aumento da segurança microbiológica de alface (*Lactuca sativa*, L.)**. São Paulo, 2003. 79p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

GRAY, M.L.; STAFSETH, H.J.; THORP Jr., F.; SHOLL, L.B.; RILEY Jr., W.F. A new technique for isolating listerellae from the bovine brain. **J. Bacteriol.**, Washington, v.55, p.471-476, 1948.

- GUERRA, M.M.; McLAUCHLIN, J.; BERNARDO, F.A. *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. **Food Microbiol.**, Sidcup, v.18, p.423-429, 2001.
- HARVEY, J.; GILMOUR, A. Occurrence and characteristics of *Listeria* in foods produced in Northern Ireland. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.19, p.193-205, 1993.
- HEISIK, J.E.; WAGNER, D.E.; NIERMAN, M.L.; PEELER, J.T. *Listeria* spp. found on fresh market produce. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.55, n.8, p.1925-1927, 1989.
- HENSLEY, W.R., ed. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. [edited by] John G. Holt...[et al.].- Edição 9th.ed. Imprensa Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.
- HITCHINS, A.D. *Listeria monocytogenes*. In: UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual**. Edição 8th.ed. Imprensa Gaithersburg, Md.: AOAC International, 1998. cap.10, p.10.01-10.13.
- HOCHBERG, A.M.; ROERING, A.; GANGAR, V.; CURIALE, M.; BARBOUR, W.M.; MROZINSKI, P.M. Sensitivity and specificity of the BAX[®] for screening/*Listeria monocytogenes* assay: Internal validation and independent laboratory study. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.84, n.4, p.1087-1097, 2001.
- HOFFMAN, A.D.; WIEDMANN, M.; Comparative evaluation of culture and BAX[®] polymerase chain reaction-based detection methods for *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in environmental and raw fish samples. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.64, n.10, p.1521-1526, 2001.

- HO, J.L.; SHANDS, K.N.; FRIEDLAND, G.; ECKIND, P.; FRASER, D.W. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.146, n.3, p.520-524, 1986.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Microorganisms in foods 5. In: **Microbiological specifications of food pathogens**. Imprenta London: Blakie Academic & Professional, 1996. Descr. Fis. 513p: il
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*** – Part 1: Detection method, International Standard ISO 11290-1: 1996, Geneva, Switzerland. Disponível em: <http://www.iso.org/iso/em/CatalogueListPage.CatalogueList?ICS1=07&ICS2=100&ICS3=30&scopelist=>. Acesso em: 30 abr. 2004.
- 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**, Amsterdam, v.15, p.275-280, 2001.
- JEONG, D.K.; FRANK, J. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.57, n.7, p.576-586, 1994.
- JOHANNESSEN, G.S.; LONCAREVIC, S.; KRUSE, H. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.77, p.199-204, 2002.
- JOHNSON, J.L. **USDA-FSIS microbiology laboratory guidebook**. Washington: U.S. Department of Agriculture, 1998. v.1 *apud* 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.**, Gaithersburg, v.85, n.2, p.505-515, 2002.

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: APHA, 2001. p.69-82.

LANDGRAF, M. **Fundamentos e perspectivas da irradiação de alimentos visando ao aumento de sua segurança e qualidade microbiológica**. São Paulo, 2002. Tese de Livre-Docência – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

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

LOUIE, M.; JAYARATNE, P.; LUCHSINGER, I.; DEVENISH, J.; YAO, J.; SCHLECH, W.; SIMOR, A. Comparison of ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed field gel electrophoresis for molecular typing of *Listeria monocytogenes*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.34, p.15-19, 1996.

LUND, B. Ecosystems in vegetable foods. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.73: S115-S116 Suppl. S, 1992. Document Type: Review

MAIJALA, R.; LYYTIKAINEN, O.; JOHANSSON, T. Exposure of *Listeria monocytogenes* in an outbreak caused by butter. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PROBLEMS OF LISTERIOSIS (ISOPOL), 14, Mannheim, 2001. **Book of abstracts**. Alemanha, 2001. p.165. S.l.: s.n.

- MONGE, R.; ARIAS, M.L. Presence of various pathogenic microorganisms in fresh vegetables in Costa Rica. **Arch. Latinoam. Nutr.**, Caracas, v.46, n.4, p.292-294, 1996.
- NGUYEN-THE, C.; CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Philadelphia, v.34, n.3, p.371-401, 1994.
- NØRRUNG, B.; ANDERSEN, J.K.; SCHLUNOTT, J. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.53, p.195-203, 1999.
- NORTON, D.M.; McCAMEY, M.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. Application of the BAX[®] for screening/genus *Listeria* polymerase chain reaction system for monitoring *Listeria* species in cold-smoked fish and in the smoked fish processing environment. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.63, n.3, p.343-346, 2000.
- 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.**, Gaithersburg, v.85, n.2, p.505-515, 2002.
- ODUMERU, J.A.; MITCHELL, S.J.; ALVES, D.M.; LYNCH, J.A.; YEE, A.J.; WANG, S.L.; STYLIADIS, S.; FARBER, J.M. Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetables for health-care food services. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.60, n.8, p.954-960, 1997.
- PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. **Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples**. Disponível em: http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/mhe-dme/compendium/volume_2/e_mfhpb3001.html. Acesso em: 1 jan. 2001.

- PETRAN, R.L.; SWANSON, K.M.J. Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.7, p.616-618, 1993.
- PETRAN, R.L.; ZATTOLA, E.A.; GRAVANI, R.B. Incidence of *Listeria monocytogenes* in market samples of fresh and frozen vegetables. **J. Food Sci.**, Chicago, v.53, n.4, p.1238-1240, 1988.
- PINGULKAR, K.; KAMAT, A.; BONGIRWAR, D. Microbiological quality of fresh leafy vegetables, salad components and ready-to-eat salads: na evidence of inhibition of *Listeria monocytogenes* in tomatoes. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, Basingstoke, v.52, p.15-23, 2001.
- PORTO, E.; UBOLDI-EIROA, M.N. Occurence of *Listeria monocytogenes* in vegetables. **Dairy, Food Environ. Sanit.**, Ames, v.21, n.4, p.282-286, 2001.
- ROCOURT, J. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p.1-20.
- RODRIGUES, D.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T. Evaluation of two methods for the detection of *Listeria* sp. and *Listeria monocytogenes* in a chicken nugget processing plant. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v.48, p.275-278, 2002.
- RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: APHA, 2001. p.343-353.
- SAGOO, S.K.; LITTLE, C.L.; MITCHELL, R.T. Microbiological quality of open ready-to-eat salad vegetables: effectiveness of food hygiene training of management. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.66, n.9, p.1581-1586, 2003b.

- SAGOO, S.K.; LITTLE, C.L.; WARD, L.; MITCHELL, R.T. Microbiological study of ready-to-eat. salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of salmonellosis. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.66, n.3, p.403-409, 2003a.
- SALAMINA, G.; DONNE, E.D.; NICCOLINI, A.; PODA, G.; CESARONI, D.; BUCCI, M.; FINI, R.; MALDINI, M.; SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BIBB, W.; ROCOURT, J.; BINKIN, N.; SALMOSO, S. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.117, p.429-436, 1996.
- SCHELCH, W.F.; LAVIGNE, P.M.; BORTOLUSSI, R.A.; ALLEN, A.C.; HALDANE, E.V.; WORT, A.J.; HIGHTOWER, A.W.; JOHNSON, S.E.; KING, S.H.; NICHOLLS, E.S.; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v.308, n.4, p.203-208, 1983.
- SCHLECH, W.F. Foodborne listeriosis. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.31, p.770-775, 2000.
- SHEARER, A.H.; STRAPP, C.M.; JOERGER, R.D. Evaluation of a polymerase chain reaction-based system for detection of *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria* spp., and *Listeria monocytogenes* on fresh fruits and vegetables. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.64, n.6, p.788-795, 2001.
- SILBERNAGEL, K.; JECHOREK, R.; BARBOUR, W.M.; MROZINSKI, P. Evaluation of the BAX[®] System for detection of *Listeria monocytogenes* in foods: collaborative study. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.87, n.2, p.395-410, 2004.
- SIZMUR, K.; WALKER, C.W. *Listeria* in prepacked salads. **Lancet**, London, v.1, n.8595, p.1167, 1988. [Letter].

- SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. Listeriosis in humans. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p.75-96.
- SORIANO, J.M.; RICO, H.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES, J. *Listeria* species in raw and ready-to-eat foods from restaurants. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.64, n.4, p.551-553, 2001.
- STEWART, D.; GENDEL, M. Specificity of the BAX[®] polymerase chain reaction system for detection of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.81, n.4, p.817-822, 1998.
- STRAPP, C.M.; SHEARER, A.E.H.; JOERGER, R. Survey of retail *Alfalfa sprouts* and mushrooms for the presence of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria* with BAX[®], and evaluation of this polymerase chain reaction-based system with experimentally contaminated samples. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.66, n.2, p.182-187, 2003.
- SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J., eds. **Food microbiology fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 2001. p.383-409.
- TOMPKIN, R.B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.65, n.4, p.709-725, 2002.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Microbiology Laboratory Guidebook**, 3rd. ed. Chapter 8, 1989. U.S. Department of Agriculture, Pittsburg, PA *apud* HOCHBERG, A.M.; ROERING, A.; GANGAR, V.; CURIALE, M.; BARBOUR, W.M.; MROZINSKI, P.M. Sensitivity and specificity of the BAX[®] for screening/*Listeria monocytogenes* assay: Internal validation and independent laboratory study. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.84, n.4, p.1087-1097, 2001.

USER´S GUIDE. **BAX[®]System PCR assay with automated detection for bacterial screening.** Wilmington, DE.: Du Pont Qualicon, 2000.

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

ZHANG, W.; HUGHES, A.; WILT, G.; KNABEL, S.J. The BAX[®] PCR assay for screening *Listeria monocytogenes* targets a partial putative gene *Imo2234*. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.67, n.7, p.1507-1511, 2004.

ZHENG, W.; KATHARIOU, S. Differentiation of epidemic-associated strains of *Listeria monocytogenes* by restriction fragment lenght polymorphism in a gene region essential for growth at low temperatures (4 °C). **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.61, p.4310-4314, 1995.

ANEXOS

ANEXO 1. Resultados dos “rack report” do BAX[®] System para detecção de *Listeria monocytogenes*.

ANEXO 1. Resultados dos “rack report” do BAX[®]System para detecção de *Listeria monocytogenes*.

File: 030303.BAX.

Rack Name:

Accession: 180

Rack Status: Rack processing completed normally.

Rack Description:

Operator:

FIU Data File: 030303.fiu

Time of Verification: 02/26/2003 21:40:10

Time of PCR Run: 03/04/2003 06:30:25

Time of Detection: 03/04/2003 07:30:11

Time of Analysis: 03/04/2003 07:30:12

W...	Sampl...	Res...	Tar...	Con...	Descri...	Lot Nu...	Target ...	Control ...	Control ...
9	I-1	Ne...	List...	Inte...	Amost...		0.00	1.00	Positive
10	I-2	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
11	I-3	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
12	I-4	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
13	I-5	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
14	I-6	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
15	I-7	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
16	I-8	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
17	I-9	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
18	I-10	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
19	I-11	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
20	I-12	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
21	I-13	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
22	I-14	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
23	I-15	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
24	I-16	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
25	I-17	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
26	I-18	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
27	I-19	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
28	I-20	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
29	I-21	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
30	I-22	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
31	I-23	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
32	I-24	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
49	cepa	Pos...	List...	Inte...			1.00	1.00	Positive

ANEXO 1. Resultados dos “rack report” do BAX® System para detecção de *Listeria monocytogenes*.

BAX® System Analysis Interface, Instrument Serial Number: Not available - 160303.BAX

File View Operation Diagnostics Help

ID #ID #

☐	☒ II-1	☒ II-9	☒ II-17	☐	☐	☒ CEPA	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ II-2	☒ II-10	☒ II-18	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ II-3	☒ II-11	☒ II-19	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ II-4	☒ II-12	☒ II-20	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ II-5	☒ II-13	☒ II-21	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ II-6	☒ II-14	☒ II-22	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ II-7	☒ II-15	☒ II-23	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ II-8	☒ II-16	☒ II-24	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Well Information

Sample ID:

Target:

Control: None

Kit Lot Number:

Description:

Data

☒ Processed

☐ Raw

Ready

Iniciar BAX® System Analysis...

PT 16:32

ANEXO 1. Resultados dos “rack report” do BAX® System para detecção de *Listeria monocytogenes*.

File: 160303.BAX.

Rack Name:

Accession: 190

Rack Status: Rack processing completed normally.

Rack Description:

Operator:

FIU Data File: 160303.fiu

Time of Verification: 03/12/2003 22:22:47

Time of PCR Run: 03/17/2003 08:07:31

Time of Detection: 03/17/2003 09:07:16

Time of Analysis: 03/17/2003 09:07:17

W...	Sampl...	Res...	Tar...	Con...	Descri...	Lot Nu...	Target ...	Control ...	Control ...
9	II-1	Ne...	List...	Inte...	Amost...		0.00	1.00	Positive
10	II-2	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
11	II-3	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
12	II-4	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
13	II-5	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
14	II-6	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
15	II-7	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
16	II-8	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
17	II-9	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
18	II-10	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
19	II-11	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
20	II-12	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
21	II-13	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
22	II-14	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
23	II-15	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
24	II-16	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
25	II-17	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
26	II-18	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
27	II-19	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
28	II-20	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
29	II-21	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
30	II-22	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
31	II-23	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
32	II-24	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
49	CEPA	Pos...	List...	Inte...			1.00	1.00	Positive

ANEXO 1. Resultados dos “rack report” do BAX®System para detecção de *Listeria monocytogenes*.

BAX® System Analysis Interface, Instrument Serial Number: Not available - D60403.BAX

File View Operation Diagnostics Help

ID #ID #

☐	☒ II-1	☒ III-9	☒ III-17	☐	☐	☒ CEPA	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ II-2	☒ III-10	☒ III-18	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ II-3	☒ III-11	☒ III-19	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ II-4	☒ III-12	☒ III-20	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ II-5	☒ III-13	☒ III-21	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ II-6	☒ III-14	☒ III-22	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ II-7	☒ III-15	☒ III-23	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ II-8	☒ III-16	☒ III-24	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Well Information

Sample ID:

Target:

Control: None

Kit Lot Number:

Description:

Data

☒ Processed

☐ Raw

Ready

Iniciar BAX® System Analys... 160303 - Perfil

PT 16:42

ANEXO 1. Resultados dos “rack report” do BAX®System para detecção de *Listeria monocytogenes*.

File: 060403.BAX.

Rack Name:

Accession: 209

Rack Status: Rack processing completed normally.

Rack Description:

Operator:

FIU Data File: 060403.fiu

Time of Verification: 04/02/2003 20:56:56

Time of PCR Run: 04/07/2003 05:51:24

Time of Detection: 04/07/2003 06:51:11

Time of Analysis: 04/07/2003 06:51:11

W...	Sampl...	Res...	Tar...	Con...	Descri...	Lot Nu...	Target ...	Control ...	Control ...
9	III-1	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
10	III-2	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
11	III-3	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
12	III-4	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
13	III-5	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
14	III-6	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
15	III-7	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
16	III-8	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
17	III-9	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
18	III-10	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
19	III-11	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
20	III-12	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
21	III-13	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
22	III-14	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
23	III-15	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
24	III-16	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
25	III-17	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
26	III-18	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
27	III-19	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
28	III-20	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
29	III-21	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
30	III-22	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
31	III-23	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
32	III-24	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
49	CEPA	Pos...	List...	Inte...			1.00	1.00	Positive

ANEXO 1. Resultados dos “rack report” do BAX®System para detecção de *Listeria monocytogenes*.

ANEXO 1. Resultados dos “rack report” do BAX[®]System para detecção de *Listeria monocytogenes*.

File: 020503.BAX.

Rack Name:

Accession: 229

Rack Status: Rack processing completed normally.

Rack Description:

Operator:

FIU Data File: 020503.fiu

Time of Verification: 05/01/2003 09:06:20

Time of PCR Run: 05/03/2003 20:06:57

Time of Detection: 05/03/2003 21:06:44

Time of Analysis: 05/03/2003 21:06:44

W...	Sampl...	Res...	Tar...	Con...	Descri...	Lot Nu...	Target ...	Control ...	Control ...
9	IV-1	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
10	IV-2	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
11	IV-3	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
12	IV-4	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
13	IV-5	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
14	IV-6	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
15	IV-7	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
16	IV-8	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
17	IV-9	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
18	IV-10	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
19	IV-11	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
20	IV-12	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
21	IV-13	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
22	IV-14	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
23	IV-15	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
24	IV-16	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
25	IV-17	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
26	IV-18	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
27	IV-19	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
28	IV-20	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
29	IV-21	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
30	IV-22	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
31	IV-23	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
32	IV-24	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
49	CEPA	Pos...	List...	Inte...			1.00	1.00	Positive

ANEXO 1. Resultados dos “rack report” do BAX® System para detecção de *Listeria monocytogenes*.

ANEXO 1. Resultados dos “rack report” do BAX[®] System para detecção de *Listeria monocytogenes*.

File: 190503.BAX.

Rack Name:

Accession: 243

Rack Status: Rack processing completed normally.

Rack Description:

Operator:

FIU Data File: 190503.fiu

Time of Verification: 05/15/2003 09:32:28

Time of PCR Run: 05/20/2003 19:08:43

Time of Detection: 05/20/2003 20:08:29

Time of Analysis: 05/20/2003 20:08:30

W...	Sampl...	Res...	Tar...	Con...	Descri...	Lot Nu...	Target ...	Control ...	Control ...
9	V-1	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
10	V-2	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
11	V-3	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
12	V-4	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
13	V-5	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
14	V-6	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
15	V-7	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
16	V-8	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
17	V-9	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
18	V-10	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
19	V-11	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
20	V-12	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
21	V-13	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
22	V-14	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
23	V-15	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
24	V-16	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
25	V-17	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
26	V-18	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
27	V-19	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
28	V-20	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
29	V-21	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
30	V-22	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
49	CEPA	Pos...	List...	Inte...			1.00	1.00	Positive

ANEXO 1. Resultados dos “rack report” do BAX®System para detecção de *Listeria monocytogenes*.

BAX® System Analysis Interface, Instrument Serial Number: Not available - 27D603.BAX

File View Operation Diagnostics Help

ID #ID #

☐	☒ VI-1	☒ VI-9	☒ VI-17	☒ VI-25	☐	☐	☒ CEPA	☐	☐	☐	☐
☐	☒ VI-2	☒ VI-10	☒ VI-18	☒ VI-26	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ VI-3	☒ VI-11	☒ VI-19	☒ VI-27	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ VI-4	☒ VI-12	☒ VI-20	☒ VI-28	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ VI-5	☒ VI-13	☒ VI-21	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ VI-6	☒ VI-14	☒ VI-22	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ VI-7	☒ VI-15	☒ VI-23	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ VI-8	☒ VI-16	☒ VI-24	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Well Information

Sample ID:

Target:

Control: None

Kit Lot Number:

Description:

Data

☒ Processed ☐ Raw

Ready

Windows Taskbar: Iniciar, BAX® System Analysis..., Sem título - Bloco de ..., 10:47

ANEXO 1. Resultados dos “rack report” do BAX[®]System para detecção de *Listeria monocytogenes*.

File: 270603.BAX.

Rack Name:

Accession: 301

Rack Status: Rack processing completed normally.

Rack Description:

Operator:

FIU Data File: 270603.fiu

Time of Verification: 06/26/2003 09:05:55

Time of PCR Run: 06/28/2003 21:10:20

Time of Detection: 06/28/2003 22:10:06

Time of Analysis: 06/28/2003 22:10:07

W...	Sampl...	Res...	Tar...	Con...	Descri...	Lot Nu...	Target ...	Control ...	Control ...
9	VI-1	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
10	VI-2	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
11	VI-3	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
12	VI-4	Pos...	List...	Inte...			1.00	1.00	Positive
13	VI-5	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
14	VI-6	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
15	VI-7	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
16	VI-8	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
17	VI-9	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
18	VI-10	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
19	VI-11	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
20	VI-12	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
21	VI-13	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
22	VI-14	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
23	VI-15	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
24	VI-16	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
25	VI-17	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
26	VI-18	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
27	VI-19	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
28	VI-20	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
29	VI-21	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
30	VI-22	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
31	VI-23	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
32	VI-24	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
33	VI-25	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
34	VI-26	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
35	VI-27	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
36	VI-28	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
57	CEPA	Pos...	List...	Inte...			1.00	1.00	Positive

ANEXO 1. Resultados dos “rack report” do BAX[®]System para detecção de *Listeria monocytogenes*.

BAX[®] System Analysis Interface, Instrument Serial Number: Not available - D40703.BAX

File View Operation Diagnostics Help

ID #ID #

☐	☒ VII-1	☒ VII-9	☒ VII-17	☒ VII-25	☒ VII-33	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ VII-2	☒ VII-10	☒ VII-18	☒ VII-26	☒ VII-34	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ VII-3	☒ VII-11	☒ VII-19	☒ VII-27	☒ VII-35	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ VII-4	☒ VII-12	☒ VII-20	☒ VII-28	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ VII-5	☒ VII-13	☒ VII-21	☒ VII-29	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ VII-6	☒ VII-14	☒ VII-22	☒ VII-30	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ VII-7	☒ VII-15	☒ VII-23	☒ VII-31	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☒ VII-8	☒ VII-16	☒ VII-24	☒ VII-32	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Well Information

Sample ID:

Target:

Control: None

Kit Lot Number:

Description:

Data

☒ Processed

☐ Raw

Ready

Iniciar BAX[®] System Analysis... Sem título - Bloco de ...

PT 16:48

ANEXO 1. Resultados dos “rack report” do BAX[®]System para detecção de *Listeria monocytogenes*.

File: 040703.BAX.										Page 1 of 2
Rack Name:										
Accession: 312										
Rack Status: Rack processing completed normally.										
Rack Description:										
Operator:										
FIU Data File: 040703.fiu										
Time of Verification: 07/03/2003 10:16:41										
Time of PCR Run: 07/06/2003 00:19:12										
Time of Detection: 07/06/2003 01:18:59										
Time of Analysis: 07/06/2003 01:19:00										
W...	Sampl...	Res...	Tar...	Con...	Descr...	Lot Nu...	Target ...	Control ...	Control ...	
9	VII-1	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
10	VII-2	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
11	VII-3	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
12	VII-4	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
13	VII-5	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
14	VII-6	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
15	VII-7	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
16	VII-8	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
17	VII-9	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
18	VII-10	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
19	VII-11	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
20	VII-12	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
21	VII-13	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
22	VII-14	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
23	VII-15	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
24	VII-16	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
25	VII-17	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
26	VII-18	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
27	VII-19	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
28	VII-20	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
29	VII-21	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
30	VII-22	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
31	VII-23	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
32	VII-24	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
33	VII-25	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
34	VII-26	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
35	VII-27	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
36	VII-28	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
37	VII-29	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
38	VII-30	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
39	VII-31	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	
40	VII-32	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive	

ANEXO 1. Resultados dos “rack report” do BAX®System para detecção de *Listeria monocytogenes*.

File: 040703.BAX.

Page 2 of 2

Rack Name:

Accession: 312

Rack Status: Rack processing completed normally.

Rack Description:

Operator:

FIU Data File: 040703.fiu

Time of Verification: 07/03/2003 10:16:41

Time of PCR Run: 07/06/2003 00:19:12

Time of Detection: 07/06/2003 01:18:59

Time of Analysis: 07/06/2003 01:19:00

W...	Sampl...	Res...	Tar...	Con...	Descri...	Lot Nu...	Target ...	Control ...	Control ...
41	VII-33	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
42	VII-34	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
43	VII-35	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive

ANEXO 1. Resultados dos “rack report” do BAX® System para detecção de *Listeria monocytogenes*.

ANEXO 1. Resultados dos “rack report” do BAX[®] System para detecção de *Listeria monocytogenes*.

File: 170703.BAX.

Rack Name:

Accession: 331

Rack Status: Rack processing completed normally.

Rack Description:

Operator:

FIU Data File: 170703.fiu

Time of Verification: 07/17/2003 09:22:41

Time of PCR Run: 07/19/2003 00:14:11

Time of Detection: 07/19/2003 01:13:56

Time of Analysis: 07/19/2003 01:13:57

W...	Sampl...	Res...	Tar...	Con...	Descri...	Lot Nu...	Target ...	Control ...	Control ...
9	VIII-1	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
10	VIII-2	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
11	VIII-3	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
12	VIII-4	Ne...	List...	Inte...			0.00	1.00	Positive
33	CEPA	Pos...	List...	Inte...			1.00	1.00	Positive

ANEXO 2. Perfil da curva de fusão (“melting curve”) de *Listeria monocytogenes* da amostra positiva (espinafre).

ANEXO 3. Perfil da curva de fusão (“melting curve”) do controle interno.

ANEXO 4. Formulação do meio de cultura empregado.

As fórmulas abaixo são equivalentes.

Enriquecimento Secundário (MOPS-BLEB*)

Formulação I

BBL <i>Listeria</i> enrichment broth (BBL#12333).....	36,1 g
MOPS free acid (Sigma#M1254).....	6,7 g
MOPS sodium salt (Sigma#M9381).....	10,5 g
Água destilada.....	1 L

Misturar os ingredientes e autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Formulação II

Caldo soja tripticaseína.....	30,0 g	Cicloheximida.....	50 mg
MOPS free acid.....	6,7 g	Acriflavina HCl.....	15 mg
MOPS sodium salt.....	10,5 g	Ácido Nalidíxico.....	40 mg
Extrato de levedura.....	6,0 g		
Água destilada.....	1 L		

Dissolver o caldo soja tripticaseína com os MOPS e o extrato de levedura em água destilada. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Preparar soluções estoque a 0,5% (p/v) de acriflavina e de ácido nalidíxico em água, e de cicloheximida a 1% (p/v) em solução de etanol a 40% (v/v). Esterilizar as soluções por filtração utilizando membrana 0,2 µm. Adicionar 0,683 mL de acriflavina, 1,8 mL de ácido nalidíxico e 1,15 mL de cicloheximida para cada 225 mL de caldo de enriquecimento.

*3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid – buffered *Listeria* enrichment broth (Caldo tamponado para enriquecimento de *Listeria* – ácido 3-(N-Morpholino) propanosulfônico)