

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

**Avaliação da viabilidade do emprego dos testes VIA e
UNIQUE (TECRA[®] Diagnostics) e VIP[®] (BioControl Systems)
para triagem da presença de *Listeria* sp em produtos
cárneos**

Lina Casale Aragon-Alegro

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

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

São Paulo
2004

Lina Casale Aragon-Alegro

Avaliação da viabilidade do emprego dos testes VIA e UNIQUE (TECRA[®] Diagnostics) e VIP[®] (BioControl Systems) para triagem da presença de *Listeria* sp em produtos cárneos.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

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

Prof^a. Dr^a. Mariza Landgraf
(1^o examinador)

Prof^a. Dr^a. Elaine Pereira De Martinis
(2^o examinador)

São Paulo, 06 de fevereiro de 2004.

SUMÁRIO

	Página
Resumo.....	IX
Abstract	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Características gerais.....	2
1.2. Alguns surtos de listeriose.....	6
1.3. Metodologias de análise.....	8
2. OBJETIVO.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Material.....	19
3.1.1. Preparo das amostras.....	20
3.2. Métodos.....	20
3.2.1. Pesquisa de <i>Listeria</i> sp pelo método clássico.....	20
3.2.2. Pesquisa de <i>Listeria</i> sp pelos testes alternativos.....	21
3.2.3. Análise dos resultados.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1. Ocorrência de <i>Listeria</i> sp e <i>Listeria monocytogenes</i>	28
4.2. Avaliação da eficiência dos três testes estudados.....	30
5. CONCLUSÕES.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Representação esquemática de um teste ELISA tipo sanduíche.....	12
Figura 2	Teste <i>Listeria</i> Visual Immunoassay (LisVIA - Tecra® Diagnostics).....	13
Figura 3	Teste Visual Immunoprecipitate Assay (VIP® - BioControl Systems).....	14
Figura 4	Teste UNIQUE <i>Listeria</i> (Tecra® Diagnostics).....	16
Figura 5	Representação esquemática da metodologia para análise de <i>Listeria</i> sp em carne bovina moída, empregando-se o teste Tecra® VIA.....	22
Figura 6	Representação esquemática da metodologia para análise de <i>Listeria</i> sp em presunto fatiado e salsicha, empregando-se o teste Tecra® VIA.....	23
Figura 7	Representação esquemática da metodologia para análise de <i>Listeria</i> sp em carne bovina moída, empregando-se o teste Tecra® UNIQUE.....	24
Figura 8	Representação esquemática da metodologia para análise de <i>Listeria</i> sp em presunto fatiado e salsicha, empregando-se o teste Tecra® UNIQUE.....	25
Figura 9	Representação esquemática da metodologia para análise de <i>Listeria</i> sp, empregando-se o teste BioControl VIP® para <i>Listeria</i>	26
Figura 10	Limites de confiança para a concordância entre os testes rápidos e o método clássico, para a totalidade das amostras examinadas.....	36
Figura 11	Limites de confiança para a concordância entre o teste VIA e o método clássico, para amostras de carne e seus derivados.....	38
Figura 12	Limites de confiança para a concordância entre o teste UNIQUE e o método clássico, para amostras de carne e seus derivados.....	39
Figura 13	Limites de confiança para a concordância entre o teste VIP® e o clássico, para amostras de carne e seus derivados.....	40
Figura 14	Limites de confiança para a concordância entre os testes utilizados e o clássico, para amostras de carne e seus derivados.....	41
Figura 15	Quadro comparativo do tempo necessário para a obtenção de resultado negativo pelos métodos rápidos e convencional, para pesquisa de <i>Listeria</i> sp em alimentos.....	47

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Ocorrência de <i>Listeria</i> sp e <i>L. monocytogenes</i> em 40 amostras de cada produto analisado.....	29
Tabela 2 Número de amostras positivas para <i>Listeria</i> sp dentre as 120 analisadas de produtos cárneos, de acordo com o teste de detecção.....	31
Tabela 3 Número de amostras positivas para <i>Listeria</i> sp dentre as 40 analisadas de presunto fatiado, de acordo com o teste de detecção.....	33
Tabela 4 Número de amostras positivas para <i>Listeria</i> sp dentre as 40 analisadas de carne bovina moída, de acordo com o teste de detecção.....	34
Tabela 5 Número de amostras positivas para <i>Listeria</i> sp dentre as 40 analisadas de salsicha a granel, de acordo com o teste de detecção.....	35

Sobre tudo o que se deve guardar,
guarda o teu coração,
porque dele procedem as saídas da vida.

Pv 4.23

Dedico

aos meus pais, Flavinho e Terê. Obrigada pelo incentivo e pelo amor incondicional.

ao João, amigo, namorado, noivo e marido, durante a elaboração deste trabalho. Obrigada por confiar em mim e por me fazer acreditar no meu potencial. Amo você!

Agradeço

a Deus, pela vida. Pela sua constante presença no meu dia-a-dia.

à Profª Drª Maria Teresa Destro, pelas orientações, sempre tão oportunas. Seus ensinamentos, certamente, nortearão minhas próximas pesquisas.

à amiga Maria Teresa, por tudo que significou (e significa) para mim. Obrigada pelas (nem sempre merecidas) broncas e pelos conselhos, nos momentos de indecisão na minha vida pessoal. E, sobretudo, pelos papos nos "bares da vida" (aqui, o Álvaro também é cúmplice). Valeu pelo carinho, amiga!

à Mariza Landgraf, pelo apoio profissional e pelos momentos de descontração. E pela amizade. Obrigada por me acalmar durante a entrevista para seleção do doutorado.

à Bernadette Franco, pelas valiosas sugestões no meu exame de qualificação. Obrigada pela confiança e amizade.

ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, pela análise estatística dos dados desta pesquisa, atendendo-me, sempre tão disposta e carinhosamente, inclusive nos finais de semana.

à Kátia e à Dona Lucinha, tão sérias no trabalho, mas não tão sérias nos bate-papos do nosso dia-a-dia.

à Roberta Wittmann, pela ajuda na parte experimental do meu trabalho. Obrigada pela dedicação e amizade.

à minha mamãe, que, sempre que pode, corrige meu português. (Apesar de eu achar que nessa frase há excesso de vírgulas.)

ao Davi e ao Caio, meus irmãos, pelo permanente contato, pelas gozações e pelo carinho. Vocês são muito importantes para mim!

aos meus avós, Raphael/Alda, Thomaz/Maura, João/Iolanda e Sarita. Tenham a certeza de que vocês significam muito para mim.

aos meus mais recentes pais, Roberto e Maria Helena, por terem me adotado completamente. Amo vocês!

ao Tavo, Lu, Martha, Alexandre e Julinha, meus cunhados prediletos. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

à Cláudia Rosa, pelo apoio e amizade no início (nada tranquilo) da minha vida na cidade grande.

à Angelinha, amiga de todas as horas, com quem dividi armários, gavetas, problemas e alegrias. São inesquecíveis aquelas manhãs na piscina do CEPEUSP.

à Cecilinha, pela grande amizade. Parece que nos conhecemos desde a infância!

ao pessoal do laboratório, Alcina, Antônio (obrigada, amigo!), Cristiano, Cristina, Dory, Eb, Fábio, Gabriela, Giovana, Gunnar, Hans, Jane, Janine, Juliana, Kátia, Laércio, Luciano, Mônica, Patrícia Kary, Patrícia Bettini, Paula, Paulo, Ricardo, Vanessa Tsu, Vanessa Vieira, Vinícius, Viviane. Valeu!

aos amigos do Bloco 16, César, Chiu, Denize, Flávia, Juliana e Maurício.

aos funcionários da secretaria do Bloco 14, Bel, Tânia, Mônica e Ângela.

aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, Jorge, Benê e às duas Elaines.

à BioControl Systems, pela doação dos testes VIP[®] para *Listeria*. Obrigada também pelo suporte técnico e pela atenção.

à Madasa do Brasil, pela doação dos testes UNIQUE e VIA para *Listeria*.

à Fapesp, pelo apoio financeiro (processos 01/10054-3 e 01/10055-0).

Resumo

Surtos de listeriose têm sido causa de preocupação para indústrias de alimentos e profissionais da saúde. Os testes de rotina para detecção de *Listeria* sp em alimentos são demorados e envolvem o uso de meios de cultura seletivos para enriquecimento e semeadura. Neste estudo, a presença de *Listeria* sp, em amostras de produtos cárneos, foi investigada por testes imunológicos rápidos (Tecra[®] *Listeria* VIA, Tecra[®] *Listeria* UNIQUE e BioControl VIP[®] para *Listeria*) e pelo método clássico (Health Protection Branch, Canadá). A concordância entre o método clássico e os testes rápidos foi estabelecida com limite de 95% de confiança. Verificou-se que os testes VIA e VIP[®] são de fácil execução e rápidos, além de apresentarem desempenho comparável ao do método clássico, independentemente do alimento avaliado. O teste UNIQUE apresentou desempenho variável com a amostra e gerou um número elevado de resultados positivos falsos, o que dificulta seu emprego.

Abstract

Outbreaks of human listeriosis have been a cause of concern to the food industry and health professionals. The routine methods for detecting *Listeria* sp in foods are time-consuming and involve the use of selective enrichments and culturing on selective agars. In this study, the presence of *Listeria* sp in 120 meat and meat products samples was investigated by three rapid immunoassays (Tecra[®] *Listeria* VIA, *Listeria* UNIQUE and BioControl VIP[®] for *Listeria*) and a cultural procedure. The detection of *Listeria* sp by the cultural method was done according to Canada's Health Protection Branch Method and the detection using rapid tests was done following the manufacturers' instructions. The agreement between cultural and rapid tests was established at a confidence limit of 95%. Eighty-one samples (67.5%) were *Listeria* sp positive by at least one of the four methods. *L. monocytogenes* was present in 49.2% of the samples. Sixty-four samples (53.3%) were positive by the cultural procedure. For the rapid tests, 62 (51.7%) were VIA positive, 65 (54.2%) were VIP[®] positive and 41 (50.2%) were UNIQUE positive. Fifty-five samples (45.8%) were positive by the cultural method and VIA simultaneously, 55 (45.8%) by the cultural method and VIP[®] and 35 (43.2%) by the cultural and UNIQUE. VIA detected 4 positive samples that were not detected by any of the other methods, while VIP detected 7 positive samples and UNIQUE only 2. VIA and VIP[®] tests are fast and easy to execute. They also performed similarly to the cultural method despite the food matrix. UNIQUE, on the other hand, was strongly influenced by the sample type and generated a high number of false positive results what makes its use unpractical.

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recebe relatórios sobre doenças de origem alimentar (ETA) de todo o mundo. Nos últimos anos, esses relatos parecem indicar um aumento do número de surtos, sendo que a contaminação microbiológica dos alimentos é a principal causa das doenças.

Cerca de 40% das enfermidades de origem alimentar ocorrem em casa; surtos resultantes de deficiências no processamento dos alimentos em estabelecimentos comerciais são responsáveis por 22% do total (FAO, 2002).

Devido à alta escala de produção de alimentos, qualquer falha no controle da higiene pode afetar grande número de pessoas, causando perdas de saúde e econômicas.

Alimentos de origem animal são a principal fonte de contaminação por muitas bactérias responsáveis por enfermidades transmitidas por alimentos. Dentre as principais bactérias que causam doenças de origem alimentar em humanos, destacam-se: *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157, *Campylobacter jejuni* e *Listeria monocytogenes* (CDC, 1999).

Listeria monocytogenes é um patógeno de interesse para as indústrias de alimentos e profissionais de saúde. Apesar de o número de casos de listeriose ser bem inferior ao das demais ETA, sua importância está relacionada à alta taxa de mortalidade associada a esse patógeno.

1.1. Características gerais

Segundo o Manual Bergey (Hensyl, 1994), *Listeria* é um bacilo pequeno, 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 anaeróbia facultativa (Hensyl, 1994). A multiplicação ocorre rapidamente na maioria dos meios bacteriológicos utilizados na rotina laboratorial (Ryser & Donnelly, 2001). Sete espécies de *Listeria* são reconhecidas: *L. innocua*, *L. grayi* e *L. murrayi* são consideradas não-patogênicas; *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. welshimeri* raramente causam infecções, enquanto *L. monocytogenes* é patogênica e a mais importante espécie nos casos de infecções transmitidas pelos alimentos (Rocourt, 1999).

São conhecidas 13 sorovarietades, mas somente três (4b, 1/2a e 1/2b) são responsáveis por 89% a 96% dos casos de listeriose humana (ICMSF, 1996; Tompkim, 2002), havendo predomínio do sorotipo 4b nos casos de doença (Zheng & Kathariou, 1995; Louie et al., 1996). Convém observar que um pequeno número de linhagens clonais tem sido responsável por muitos surtos de listeriose em todo o mundo (Tompkim, 2002).

Listeria pode se multiplicar em temperaturas de 2,5°C a 44°C, com temperatura ótima entre 30-37°C, embora existam relatos sobre a multiplicação a 0°C, representando um significativo perigo para a saúde em alimentos mantidos sob refrigeração. Esse microrganismo suporta ciclos repetidos de congelamento e descongelamento (Walker et al., 1987; Junttila et al., 1988; Lou & Yousef, 1999).

Embora o pH ótimo para multiplicação esteja entre 6,0 e 8,0, ela pode se multiplicar em uma faixa mais ampla, entre 5,0 e 9,0 (ICMSF, 1996). A atividade de água ótima para sua multiplicação é $\geq 0,97$ (Franco & Landgraf, 1996), contudo essa bactéria tem capacidade de se multiplicar em atividade de água de até 0,90 (Lou & Yousef, 1999), considerada baixa para a multiplicação de patógenos.

Duas características importantes da *L. monocytogenes*, do ponto de vista de multiplicação, são a osmotolerância e a criotolerância, que a tornam preocupante para a saúde pública e para as empresas de alimentos, uma vez que a salga e a refrigeração são os mais antigos e comuns métodos de conservação de produtos alimentícios (Baek et al., 2000).

Listeria sp encontra-se amplamente distribuída pela natureza, fato que pode causar a contaminação dos alimentos durante a sua produção e distribuição (Boer & Beumer, 1999). Tem os humanos e os animais como reservatórios. Os alimentos associados com a transmissão da doença são geralmente processados industrialmente, têm vida de prateleira longa em temperatura de refrigeração, são capazes de permitir a multiplicação de *L. monocytogenes* e são consumidos sem cocção prévia (Rocourt, 1999). Dentre os alimentos já envolvidos nos surtos de listeriose, têm-se leite cru e pasteurizado, queijos, carnes bovina, suína e 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). *Listeria* tem sido isolada de uma grande variedade de alimentos, assim como de amostras ambientais (Ryser & Donnelly, 2001).

Apesar de diversas formas de transmissão do microrganismo a humanos já terem sido relatadas, a via alimentar parece ser a mais importante. 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 pessoas pertencentes ao grupo de risco, como 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).

Atualmente, sabe-se da existência de dois “tipos” de listeriose. Há um mais brando, que se apresenta como uma doença gastrointestinal autolimitada e não invasiva, caracterizada pelo desenvolvimento de febre, diarreia, náusea, vômito, dor de cabeça e mialgia, dentro de 12 a 24 horas após a exposição (Salamina et al., 1996).

O segundo tipo está relacionado à forma mais grave da doença, que compromete principalmente o sistema nervoso central, manifestando-se pelo aparecimento de meningite, encefalite e abscessos ou provocando aborto durante a gravidez. Endocardites e osteomielites também podem ocorrer, mas são raras (Slutsker & Schuchat, 1999). O período de incubação da listeriose varia de um dia a algumas semanas (Slutsker & Schuchat, 1999).

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 entre $10^3 - 10^4$ UFC/g (Unidades Formadoras de Colônia/g de alimento) foram responsáveis pela doença (Duffy et al., 1999). Estudo conduzido na Finlândia mostrou que a exposição da população de risco a doses baixas (0,3NMP/g) de *L. monocytogenes*, por períodos prolongados, pode também levar ao desenvolvimento da doença (Maijala et al., 2001).

Embora rara e responsável por apenas 0,02% de todas as doenças de origem alimentar, nos Estados Unidos, a listeriose é responsável por cerca de 28% das mortes resultantes dessas doenças (Tompkin, 2002).

1.2. Alguns surtos de listeriose

Um surto de doença de origem alimentar é caracterizado quando: (a) duas ou mais pessoas apresentam sintomas similares, após ingestão de um mesmo alimento e (b) a análise epidemiológica implica um alimento como fonte da doença (Bean et al., 1990).

A ocorrência de *Listeria monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo tem sido causa de preocupação para as autoridades da área de saúde pública, bem como para as empresas processadoras de alimentos. Surtos recentes ocorridos nos Estados Unidos (CDC, 1999; CDC, 2000; CDC 2002), França (Vaillant et al., 2001) e Suécia (Tham et al., 2001) foram relacionados com a ingestão de produtos de origem animal prontos para o consumo, afetaram um número grande de pessoas e apresentaram elevada taxa de mortalidade.

A maioria dos surtos de listeriose tem ocorrido em países desenvolvidos, como Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, França e Holanda (Choi et al., 2001), sendo eles relatados na Europa e América do Norte desde os anos 80. O primeiro documentado ocorreu em 1981, no Canadá, quando 41 pessoas ficaram doentes após ingerirem salada de repolho tipo "coleslaw"; a taxa de mortalidade foi superior a 28% (Schlech et al., 1983).

Em julho de 1994, nos Estados Unidos, 66 pessoas desenvolveram listeriose após consumirem leite achocolatado pasteurizado. Ao contrário dos surtos normalmente notificados até então, os sintomas gastrintestinais (diarréia, febre, náusea e vômito) predominaram. Cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2b foram encontradas no leite achocolatado nos níveis de 10^8 a 10^9 UFC/mL (Dalton et al., 1997).

Em 1998, nos Estados Unidos, 40 casos de infecção provocada pela ingestão de salsichas tipo "hot dog", contaminadas por *L. monocytogenes*, foram identificados em dez estados. Todas as cepas eram do sorotipo 4b e apresentavam um perfil de DNA pouco usual quando foram subtipadas por eletroforese em gel de campo pulsado e ribotipagem (CDC, 1998).

Na Finlândia, entre 1998 e 1999, 25 pessoas ficaram doentes após ingestão de manteiga contaminada com *Listeria monocytogenes* sorotipo 3a; dentre estas pessoas, 15 tinham o sistema imunológico comprometido (Maijala et al., 2001).

Na Dinamarca, 121 casos de infecção por *L. monocytogenes* foram notificados entre 1998 e 2000; 69 pessoas pertenciam a grupos de risco, sendo que 25 morreram. Das cepas isoladas, 65% eram do sorotipo 1/2 (Gerner-Smidt et al., 2001).

No ano 2000, nos Estados Unidos, 29 pessoas de dez estados ficaram doentes, e quatro delas morreram, após ingerirem carne de peru pronta para consumo ("turkey deli meats"), contaminada com o microrganismo (CDC, 2000).

Na França, ocorreram, em 2000, dois surtos de listeriose relacionados ao consumo de "rillets" (língua de porco em geléia), entretanto o perfil molecular das cepas isoladas, nos dois surtos, era diferente. No primeiro, dez pessoas desenvolveram a doença, enquanto que não se têm informações sobre o número de envolvidos no segundo (Vaillant et al., 2001).

No ano 2000, na Carolina do Norte, nos Estados Unidos, 12 casos de listeriose ocorreram devido à ingestão de queijo tipo mexicano contaminado com *L. monocytogenes* (CDC, 2001).

Mais recentemente, em 2002, 2 casos de listeriose foram relatados em Vancouver, no Canadá. As pessoas, que apresentaram meningite, consumiram queijo contaminado com *L. monocytogenes* (HEALTH CANADA, 2002). Em 2003,

nos Estados Unidos, pacotes de queijo tipo mineiro foram recolhidos, após um teste de rotina revelar a presença de *Listeria monocytogenes* no alimento. Não foi relatada a ocorrência de doentes (FDA, 2003).

1.3. Metodologias de análise

A análise de alimentos visando verificar a presença de bactérias patogênicas e deteriorantes é prática rotineira para monitorar a segurança e a qualidade dos alimentos (Boer & Beumer, 1999).

Surtos recentes de listeriose, causados por alimentos contaminados com *Listeria monocytogenes*, e a alta taxa de mortalidade associada a eles têm aumentado a preocupação com esse patógeno (Peng & Shelef, 2000).

Embora a caracterização das cepas de *Listeria* sp seja relativamente simples, seu isolamento a partir de alimentos é demorado e envolve diversas etapas. As metodologias rotineiras para a pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos, usualmente, constam de procedimentos de enriquecimento seriado, utilizando-se um cultivo primário em meio pouco seletivo, seguido por um enriquecimento secundário em meio seletivo e isolamento em pelo menos dois ágaros diferenciais. A espécie é determinada submetendo-se as colônias suspeitas a testes bioquímicos. Exemplos deste procedimento são os métodos preconizados ou validados pelo United States Department of Agriculture (USDA), Food and Drug Administration (FDA), AOAC ou American Public Health Association (APHA).

Assim, a pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos pode levar de cinco a dez dias, o que é muito importante particularmente para alimentos com vida pequena de prateleira, pois estes têm sua liberação retardada (Vaz-Velho et al.,

2000) ou são freqüentemente comercializados antes que os resultados dos testes sejam obtidos (Candrian, 1995).

Algumas vezes, os resultados negativos não refletem a realidade, pois as células de *Listeria* presentes no alimento podem apresentar injúria subletal ou estar em números inferiores à microbiota acompanhante.

Sabe-se também que o isolamento de espécies não patogênicas de *Listeria*, em alimentos, não exclui a possibilidade de *L. monocytogenes* estar presente (Curiale & Lewus, 1994). *L. innocua* multiplica-se mais rapidamente que *L. monocytogenes*, tanto em meio não seletivo (Duh, 1993) como em meio de enriquecimento seletivo (Petran & Swanson, 1993).

A obtenção de resultados em um curto período de tempo possibilita intervenções mais rápidas, como eventuais correções no processamento do alimento, a retirada de um lote do comércio e, para produtos frescos, uma comercialização mais rápida (Barbuti et al., 2000). Dessa forma, há a necessidade de métodos mais rápidos que forneçam informações sobre a provável presença do patógeno na matéria-prima inicial e nos produtos já prontos, tanto para o controle do processo de fabricação como para o monitoramento da limpeza e das práticas higiênicas (Ingianni et al., 2001).

Diversos testes não convencionais para a pesquisa de *Listeria* sp, em alimentos, estão disponíveis no mercado. Alguns são específicos para *L. monocytogenes*, mas a maioria é gênero-específico. No geral, os testes não convencionais são variações de formatos já utilizados para detecção de outros microrganismos (ou suas toxinas), com seus componentes alterados especificamente para detectar *Listeria*. Todos esses testes requerem um enriquecimento primário, para aumentar seletivamente a população alvo para níveis detectáveis (Rocourt, 1999).

Cada teste possui vantagens e desvantagens. Um teste ótimo para utilização em rotina deve ser de fácil execução por técnicos não especializados, sensível para detectar até 1 célula/grama de alimento, específico para *L. monocytogenes* (espécie patogênica para humanos), rápido — com a possibilidade de se obter o resultado em poucas horas ou um dia — e adequado para automação; além disso, não deve ser caro (Ingianni et al., 2001).

Dentre os diferentes tipos de testes existentes, aqueles empregando ensaios imunológicos têm sido bastante difundidos. Eles baseiam-se na reação de um antígeno com um anticorpo específico, que pode ser tanto monoclonal quanto policlonal (Otero et al., 1998).

Há um grande número de testes disponíveis no mercado que empregam anticorpos para detecção de certos patógenos. Os sistemas de detecção utilizados são: testes imunoenzimáticos, de aglutinação de partículas, de imunoprecipitação, imunocoloração direta, esferas paramagnéticas cobertas com anticorpos e biosensores baseados em anticorpos (Robison, 1997).

Uma variedade de testes não convencionais que utilizam técnicas imunoenzimáticas (ELISA) tem sido desenvolvida para a identificação rápida de *Listeria*, tanto em níveis de gênero como de espécie. Esses testes têm acelerado significativamente a identificação de amostras positivas para *Listeria* (Ryser & Donnelly, 2001).

Os testes imunoenzimáticos (ELISA) de aplicação em alimentos foram desenvolvidos nos anos 80, principalmente para detecção de *Salmonella* e *Listeria* (Franco, 1994). Nesses testes, os anticorpos de captura ficam adsorvidos numa matriz sólida. Em seguida, os espaços que ficam na matriz são cobertos com proteínas, para que não ocorra a ligação de antígenos na fase sólida, interferindo nos resultados. A amostra é adicionada, e, se os antígenos estiverem presentes,

eles ligam-se aos anticorpos adsorvidos. Um conjugado, formado por um segundo anticorpo ligado a uma enzima, é adicionado e liga-se ao antígeno presente. Depois, adiciona-se um substrato específico para a enzima, que é convertido a um produto final, usualmente colorido, cuja intensidade pode ser verificada a olho nu ou medida por espectrofotômetro (Robison, 1997). Esse tipo de ELISA é conhecido como “ELISA sanduíche” (figura 1).

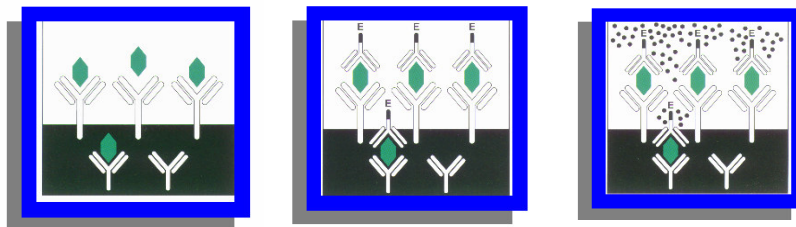


Figura 1. Representação esquemática de um teste ELISA tipo sanduíche.

Entre os testes imunoenzimáticos disponíveis comercialmente, têm-se o *Listeria* Visual Immunoassay (LisVIA), produzido pela Tecra[®] Diagnostics (Austrália), e o Visual Immunoprecipitate Assay (VIP[®]), da BioControl Systems (EUA).

O LisVIA (figura 2) emprega anticorpos policlonais específicos para *Listeria*. É composto por uma placa com 96 cavidades que contêm os anticorpos policlonais adsorvidos em suas paredes. A amostra enriquecida é adicionada na cavidade, e o antígeno, se estiver presente, liga-se aos anticorpos. Após incubação, as cavidades são lavadas, para eliminar os antígenos que não se ligaram. O conjugado (anticorpo específico para *Listeria* ligado à enzima cromogênica) é adicionado e liga-se ao antígeno presente. Por último, adiciona-se o substrato, que é convertido pela enzima cromogênica em um produto de coloração

esverdeada, quando ocorreu a ligação do antígeno com o conjugado. A cor gerada é comparada com um cartão de cor que acompanha o kit ou pode ser lida em um leitor de microplacas. O tempo total para a execução do teste, incluindo o pré-enriquecimento, é de 50 horas. O teste é considerado positivo se a coloração observada for verde ou verde- escura; se for verde muito claro ou transparente, a amostra é negativa.



Figura 2. Teste *Listeria* Visual Immunoassay (LisVIA – Tecra[®] Diagnostics).

O Visual Immunoprecipitate Assay (VIP[®]), da BioControl Systems, está representado na figura 3. É um teste que utiliza anticorpos altamente específicos para *Listeria*, estando parte deles ligada à superfície de pequenas partículas móveis de látex, coradas de azul, e outra parte imobilizada. Apresenta-se como um aparato de uso único com 3 janelas: uma, onde se coloca a amostra enriquecida; outra, onde aparece o resultado do teste; a última é do controle. A amostra enriquecida é adicionada na janela da amostra e, por capilaridade, migra até as janelas de resultado e de controle. Na primeira, se *Listeria* estiver presente, o complexo antígeno-anticorpo-partículas de látex formado liga-se a anticorpos

imobilizados na membrana. O excesso de látex carregando ou não o antígeno continuará a migrar até encontrar uma linha de anticorpos policlonais, formando uma linha azul de controle. A BioControl não informa que anticorpos estão imobilizados nas janelas de resultado e de controle. Num teste com formato semelhante (Clearview, Oxoid), o anticorpo ligado ao látex e o imobilizado é a anti-flagelina Ab, e na janela de controle é anti-IgG de camundongo. Se a linha na janela de resultados não aparecer, a amostra é considerada negativa. O tempo total para obtenção de resultado é de 52 horas.

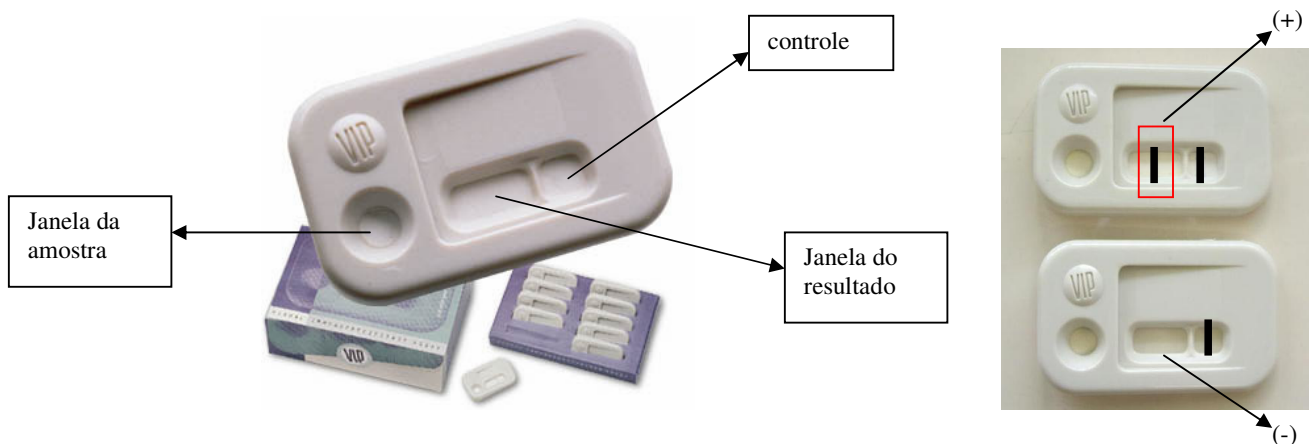


Figura 3. Teste Visual Immunoprecipitate Assay (VIP® - BioControl Systems)

No teste UNIQUE *Listeria*, utiliza-se a imunocaptura, baseada na utilização de anticorpos para "separar" o antígeno de interesse do meio onde ele está. Esses anticorpos específicos recobrem a superfície de bastões de plástico ("dipsticks") e, quando colocados em contato com uma mistura de antígenos, o antígeno alvo ligar-se-á ao anticorpo imobilizado e poderá ser isolado pela remoção do bastão.

Uma vez separado fisicamente da microbiota competidora, o organismo é submetido a um enriquecimento seletivo. Tudo isso ocorre em um módulo individual, onde todos os reagentes necessários já estão pré-distribuídos (fig. 4).

Para o teste UNIQUE *Listeria*, a amostra é inicialmente enriquecida por 24 horas, e uma alíquota de 4ml é transferida para o tubo 1 do módulo. Ao se introduzir o bastão nesse tubo, os anticorpos nele aderidos capturam as listérias presentes. A seguir, o bastão é transferido para o tubo 3, onde ocorre a multiplicação das listérias capturadas (O tubo 2 é vazio. Ele só existe porque o mesmo módulo é utilizado nos testes UNIQUE *Listeria* e *Salmonella*). O bastão é transferido para o tubo 4, onde ocorre a ligação das listérias, imobilizadas no bastão, com o conjugado (enzima cromogênica ligada a um outro anticorpo específico para *Listeria*). O excesso de conjugado ligado ao bastão é removido por lavagem (tubo 5). O bastão é então transferido ao tubo 6, onde ocorre o contato com o substrato específico para a enzima. A presença de *Listeria* é verificada pelo desenvolvimento de coloração púrpura/cinza, na metade superior do bastão. O bastão apresenta, ainda, uma região de controle positivo (que aparece como cruz púrpura no ápice) e uma região de controle negativo (na metade inferior do bastão). O tempo total para obtenção dos resultados é de 32 horas.

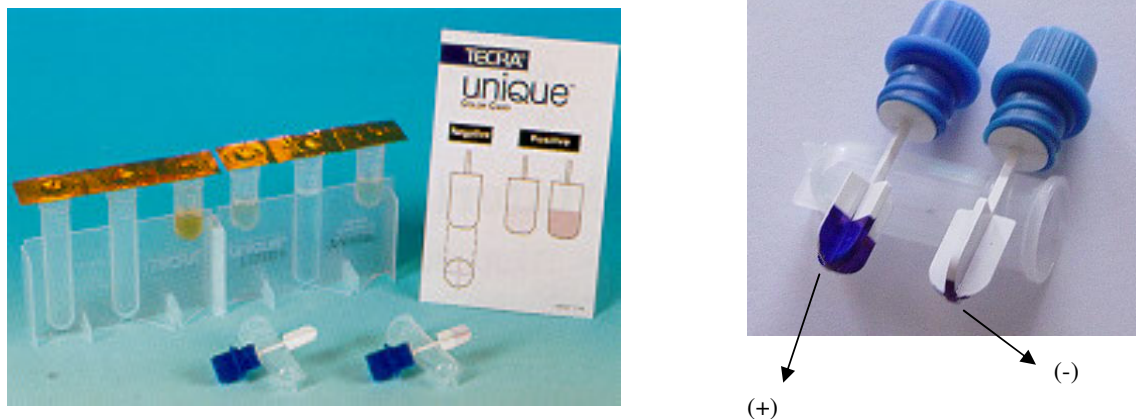


Figura 4. Teste UNIQUE *Listeria* (Tecra® Diagnostics).

É importante ressaltar que, tanto no teste LisVIA como no LisUNIQUE e no VIP®, os resultados positivos são presuntivos, ou seja, deverão ser confirmados pelos métodos tradicionais; já os resultados negativos são confirmatórios.

Poucos são os estudos relatando a eficiência desses testes não convencionais para a pesquisa de *Listeria* em alimentos.

Em 1990, Lillie & Jakobsen empregaram o Tecra® Visual Immunoassay para *Listeria* (LisVIA), em amostras de alimentos e amostras ambientais artificialmente contaminadas, e encontraram 99% de concordância entre este teste e o clássico que havia sido descrito por Skovgaard, em 1988.

Knight et al. (1996) testaram o LisVIA e observaram 94,7% de concordância entre os resultados obtidos com este teste e o método clássico (United States Department of Agriculture - USDA), com uma taxa de 3,1% de resultados falso-negativos.

Sutherland (sd) avaliou o LisVIA, analisando 360 amostras de queijos e sorvetes e 693 amostras ambientais. Para os produtos lácteos, o teste VIA indicou 40 amostras positivas, sendo que o método clássico (FDA) só detectou 30 delas.

Um total de 61 amostras ambientais foi positivo pelo teste VIA, sendo que sete destas não foram confirmadas. Não foram apresentadas as comparações entre o desempenho do VIA e o do método clássico para as amostras ambientais.

Feldsine et al. (1997) avaliaram o desempenho do teste VIP® para *Listeria* em 1509 amostras de alimentos variados (leite em pó desnatado, sorvete, carne de boi e de frango, etc.). Desse total, 370 foram confirmadas positivas, e 921, negativas, tanto pelo método clássico (FDA) como pelo VIP®. Com o VIP®, confirmaram-se como positivas 132 amostras que foram negativas pelo método clássico. Já este último permitiu a confirmação de 115 amostras positivas e que foram negativas pelo VIP®. Entretanto, dentre as 921 amostras negativas pelos dois testes, 29 mostraram-se positivas quando o caldo de enriquecimento seletivo do VIP® foi semeado em ágar seletivo. Segundo os autores, para a detecção de *Listeria* a partir de produtos crus, o teste avaliado demonstrou ser mais eficiente que o clássico.

Avaliações realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF – USP têm demonstrado que vários testes não convencionais existentes no mercado, muitas vezes, não são adequados a produtos alimentícios brasileiros, principalmente devido a interferências da microbiota acompanhante. Dessa forma, a validação desses testes com produtos alimentícios do País faz-se necessária, antes que eles sejam adotados.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do emprego dos testes LisVIA e LisUNIQUE, da Tecra[®] Diagnostics, e do VIP[®] para *Listeria*, da BioControl Systems, como triagem para detecção de *Listeria* sp em produtos cárneos comercializados na cidade de São Paulo - SP, comparando-se os resultados com os obtidos pelo método clássico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Quarenta amostras de carne moída, 40 de presunto fatiado e 40 de salsicha a granel foram adquiridas em supermercados, açougues e padarias da cidade de São Paulo – SP. As amostras foram transportadas ao laboratório em caixa isotérmica e mantidas sob refrigeração por, no máximo, 2h, até o momento da análise, no laboratório.

3.1.1. Preparo das amostras

Cada amostra de carne moída foi transferida assepticamente para uma embalagem de polietileno estéril (Nasco, EUA) e, após fechamento, foi manualmente misturada.

As amostras de presunto fatiado foram cortadas, com auxílio de bisturi estéril, em pequenos pedaços, que foram transferidos para embalagens estéreis e manualmente misturados. O mesmo foi feito com as amostras de salsicha a granel.

3.2. Métodos

3.2.1. Pesquisa de *Listeria* sp pelo método clássico

Foi utilizado o método descrito por Pagotto et al. (2001), a saber: uma porção de 25 gramas da amostra foi pesada e homogeneizada em 225ml de caldo

LEB (*Listeria* Enrichment Broth, formulação UVM, Oxoid) e incubada a 30°C, por 24 horas. Em seguida, transferiu-se 0,1ml desse caldo para um tubo contendo 10ml de caldo Fraser (Oxoid), que foi incubado a 37°C, por 24 horas. Os caldos Fraser enegrecidos foram semeados em placas de ágar Palcam e Oxford (ambos Oxoid), incubadas a 37°C/24h. Três colônias características de *Listeria*, em cada uma das placas, foram transferidas para placas de ágar soja tripticaseína adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE, ambos Oxoid), para verificação de sua pureza. A seguir, as colônias foram submetidas à identificação bioquímica, 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. As cepas confirmadas como *L. monocytogenes* foram sorogrupadas empregando-se o *Listeria* O Antiserum tipo 1 e 4 (Difco).

3.2.2. Pesquisa de *Listeria* sp pelos testes alternativos

Os testes LisVIA, LisUNIQUE e VIP® para *Listeria* foram utilizados conforme especificações dos fabricantes, apresentadas nas figuras 5, 6, 7, 8 e 9. Os caldos com resultados positivos foram semeados, por esgotamento, em placas com ágar Palcam e Oxford, incubadas, conforme descrito em 3.2.1. A verificação da pureza das cepas e sua identificação também seguiu o descrito em 3.2.1. Somente aquelas amostras em que a presença de *Listeria* foi confirmada por testes bioquímicos tradicionais foram consideradas positivas.

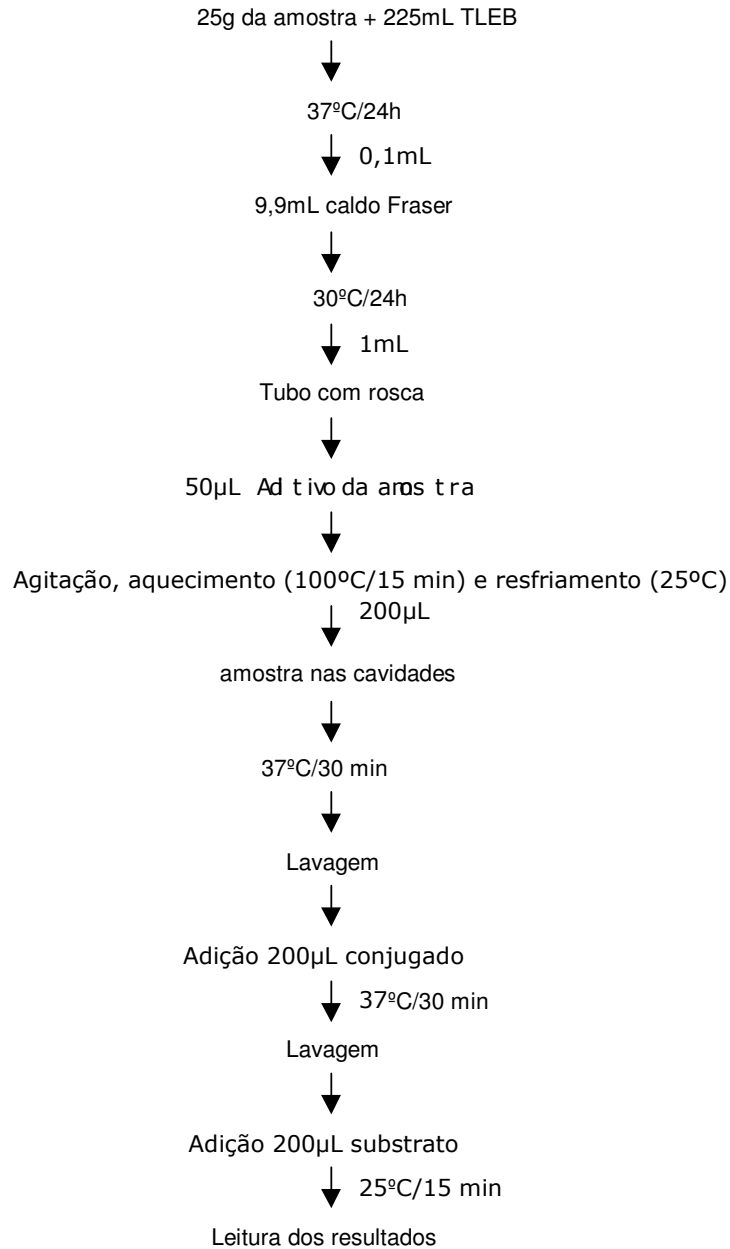


Figura 5. Representação esquemática da metodologia para análise de *Listeria* sp em carne bovina moída, empregando-se o teste Tecra® VIA. TLEB = BLEB (caldo tamponado de enriquecimento para *Listeria*, Oxoid - CM863); suplemento TLEB = ácido nalidíxico (15mg/L) + acriflavina (40mg/L); caldo Fraser (Oxoid CM895) + suplemento (Oxoid SR156).

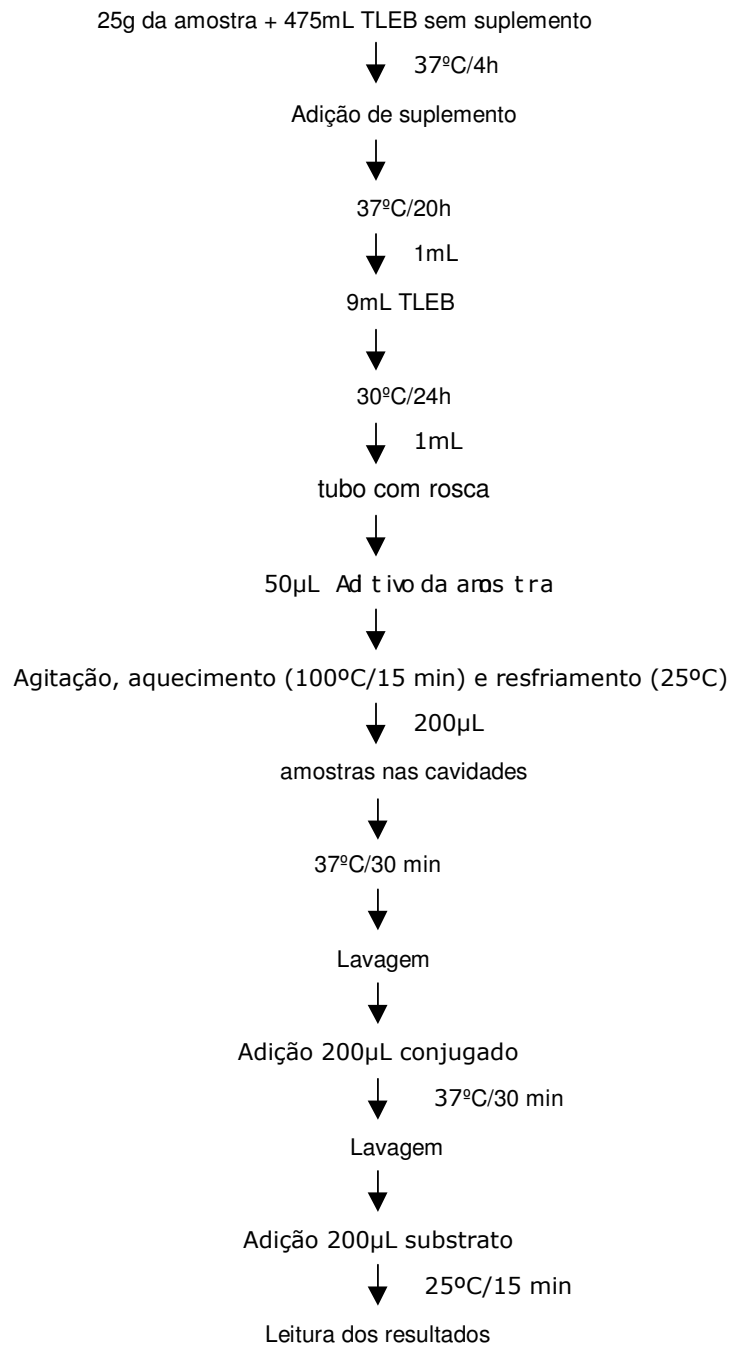


Figura 6. Representação esquemática da metodologia para análise de *Listeria* sp em presunto fatiado e salsicha, empregando-se o teste Tecra® VIA. TLEB = BLEB (caldo tamponado de enriquecimento para *Listeria*, Oxoid - CM863); suplemento TLEB= ácido nalidíxico (15mg/L) + acriflavina (40mg/L); caldo Fraser (Oxoid CM895) + suplemento (Oxoid SR156).

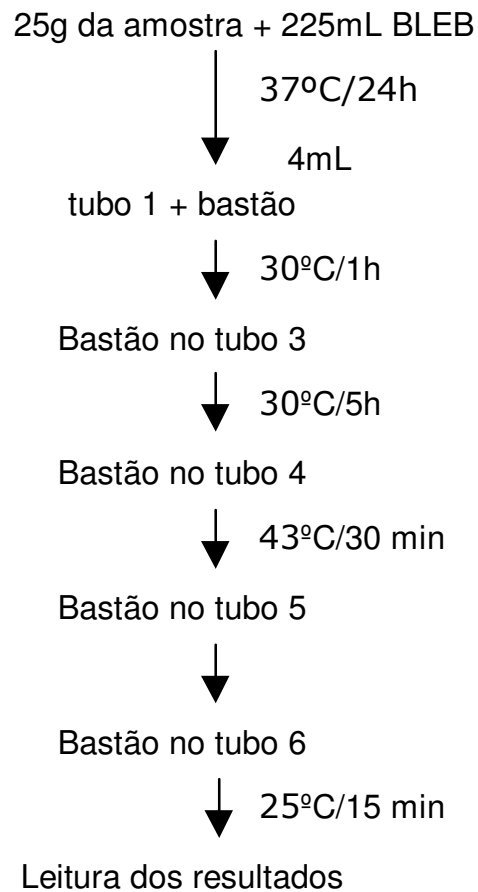


Figura 7. Representação esquemática da metodologia para análise de *Listeria* sp em carne bovina moída, empregando-se o teste Tecra® UNIQUE. BLEB = caldo tamponado para *Listeria* (Oxoid CM863) + suplemento (Oxoid – SR141).

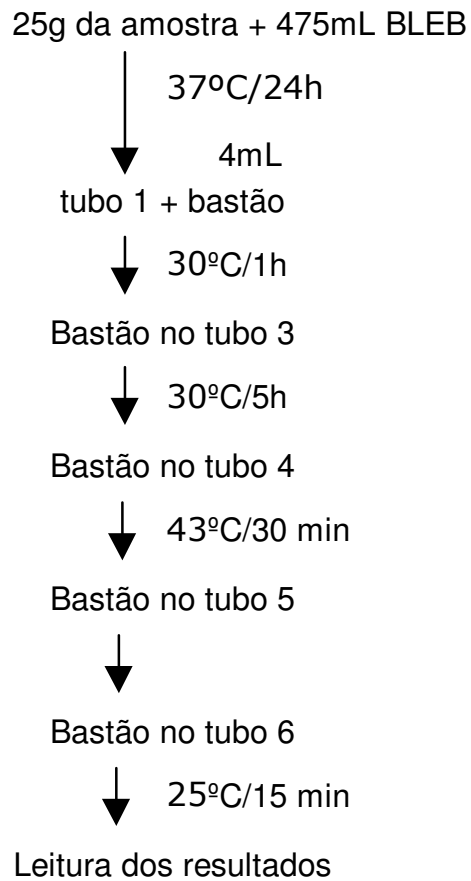


Figura 8. Representação esquemática da metodologia para análise de *Listeria* sp em presunto fatiado e salsicha, empregando-se o teste Tecra® UNIQUE. BLEB = caldo tamponado para *Listeria* (Oxoid CM863) + suplemento (Oxoid – SR141).

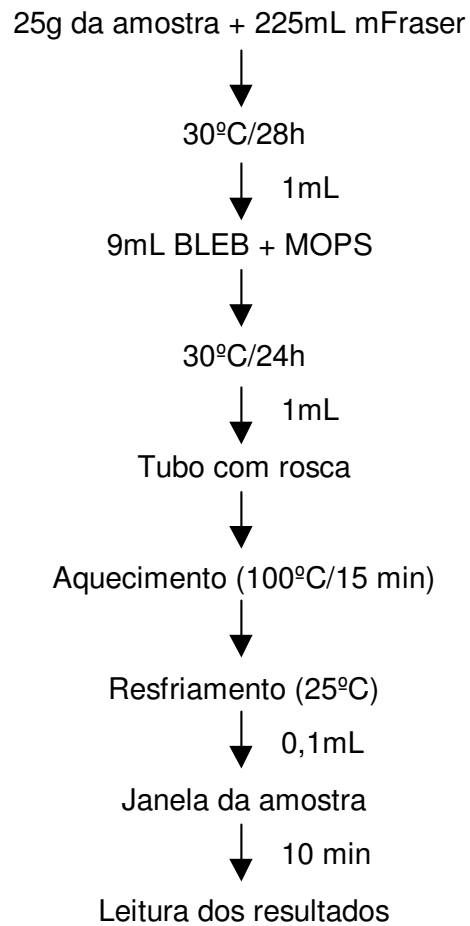


Figura 9. Representação esquemática da metodologia para análise de *Listeria* sp, empregando-se o teste BioControl VIP® para *Listeria*. MFraser = caldo Fraser (Difco 0219-17) + cloreto de lítio (4g/L); BLEB + MOPS = caldo de enriquecimento para *Listeria* (Difco 0222-17) + MOPS (Sigma M1254 - 8,5g/L) + MOPS (Sigma M9381 - 13,7g/L).

3.2.3. Análise dos resultados

Para o estudo da concordância entre os métodos alternativos e o clássico, foi estabelecido o limite de 95% de confiança para a proporção de ocorrência das concordâncias (+ e + / - e -). Quando não houve a mesma resposta nos dois métodos (+ e - / - e +), o resultado foi descrito como discordante. Para o estabelecimento dos limites de confiança, considerou-se como proporção de sucesso a concordância das respostas e, como fracasso, a discordância. A construção dos limites foi realizada a partir da distribuição binomial de probabilidades e com o nível de 95% de confiança (Norman & Streiner, 1994).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ocorrência de *Listeria sp* e *Listeria monocytogenes*

Considerando-se os quatro testes analíticos utilizados, *Listeria* foi detectada em 81 (67,5%) das 120 amostras examinadas, sendo que *Listeria monocytogenes* estava presente em 58 (48,3%) amostras. A maior porcentagem de isolamento de *L. monocytogenes* foi nas amostras de carne moída, seguida pelas de presunto e de salsicha.

A tabela 1 mostra a ocorrência de *Listeria sp* e *L. monocytogenes* em cada um dos produtos avaliados, empregando-se qualquer um dos testes utilizados.

Tabela 1. Ocorrência de *Listeria sp* e *L. monocytogenes* em 40 amostras de cada produto analisado.

Microrganismo	Produto		
	Presunto	Carne moída	Salsicha
<i>Listeria sp</i>	26 (65%)	39 (97,5%)	16 (40%)
<i>L. monocytogenes</i>	20 (50%)	27 (67,5%)	12 (30%)

Os resultados aqui apresentados são diferentes dos obtidos no Brasil por Destro et al. (1991), que encontraram a incidência de *L. monocytogenes* em 70% das salsichas; porém, os resultados são semelhantes aos daqueles autores para carne moída (65%).

Resultados inferiores aos deste estudo foram obtidos por Mesquita (1991),

que observou incidência de *L. monocytogenes* em 2% das amostras de carne moída.

Nas amostras de presunto e carne moída também foram encontradas outras espécies de *Listeria*, como *L. innocua*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri*. Nas salsichas, encontraram-se, além de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. seeligeri*.

De acordo com a sorologia realizada, todas as 20 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de presunto pertenciam ao sorogrupo 1. Das 27 cepas isoladas de carne moída, 55,6% eram do sorogrupo 4, e 44,4%, do sorogrupo 1. Para as cepas isoladas de amostras de salsicha (12), 50% pertenciam a cada sorogrupo.

O fato de todas as cepas examinadas pertencerem aos sorogrupos 1 e 4 é preocupante, uma vez que a eles pertencem as cepas usualmente relacionadas a surtos ou casos esporádicos (Tompkin, 2002).

Os valores obtidos neste trabalho podem não representar a real ocorrência de *L. monocytogenes* nos produtos analisados. Segundo Capita et al. (2001), a incidência real de *Listeria monocytogenes* nos alimentos é, geralmente, maior do que a encontrada quando se utilizam testes em que o enriquecimento é feito em temperaturas inferiores a 40°C, como neste estudo. Isso ocorre, pois os meios de cultura utilizados (como UVM e Fraser) não permitem a recuperação do microrganismo, quando um número elevado de *L. innocua* está presente, já que esta última se multiplica mais rapidamente que *L. monocytogenes*, em temperaturas menores que 40°C.

4.2. Avaliação da eficiência dos três testes estudados

Nesta avaliação, utilizou-se o seguinte critério: uma amostra foi considerada positiva quando os resultados positivos presuntivos, nos três testes rápidos estudados, foram confirmados como *Listeria* pelo isolamento do patógeno, nos meios de cultura, e posterior identificação bioquímica das colônias suspeitas. Amostras cujos resultados positivos, nos testes não convencionais, não foram confirmados como positivos por meio do mesmo procedimento de confirmação, foram consideradas negativas.

Conforme pode ser observado na tabela 2, 81 amostras foram positivas para *Listeria* sp por pelo menos um dos testes.

Tabela 2. Número de amostras positivas para *Listeria* sp dentre as 120 analisadas de produtos cárneos, de acordo com o teste de detecção.

Teste	Número de amostras positivas confirmadas	%
pelo menos um	81	100
clássico	64	79
VIA	62	76,5
UNIQUE	41	50,2
VIP	65	80,3
somente clássico	2	2,5
somente VIA	4	4,9
somente UNIQUE	2	2,5
somente VIP	6	7,4
clássico e VIA	55	67,9
clássico e UNIQUE	35	43,2
clássico e VIP	55	67,9
clássico, VIA, UNIQUE e VIP	29	35,8
somente VIA e UNIQUE	1	1,2
somente VIA e VIP	1	1,2
somente UNIQUE e VIP	1	1,2
somente VIA, UNIQUE e VIP	1	1,2

O teste VIP® foi o que permitiu a detecção do patógeno num maior número de amostras positivas (65/81, 80,3%), número esse ligeiramente superior ao encontrado pela metodologia clássica (64/81, 79%). Deve-se ressaltar que, em seis amostras, *Listeria* sp só foi detectada empregando-se esse teste (tabela 2).

Utilizando-se o teste VIA, detectaram-se 62 amostras positivas para *Listeria* sp (76,5%), entre o total de amostras positivas, e quatro delas foram positivas somente com esse teste (tabela 2).

O teste que apresentou o desempenho mais fraco foi o UNIQUE, que permitiu a detecção de *Listeria* sp em 41 das 81 amostras positivas. Entretanto, duas destas amostras foram positivas exclusivamente por esse teste (tabela 2).

Na tabela 3, observa-se que, para o presunto fatiado, 26 amostras foram positivas para *Listeria* sp por pelo menos um dos testes.

Os testes VIA e UNIQUE permitiram a detecção de um número maior de amostras positivas que o método clássico, com 23 (88,5%), 22 (84,6%) e 21 (80,8%) amostras positivas, respectivamente. O teste VIA possibilitou a detecção de *Listeria* em três amostras de presunto, e o UNIQUE em uma, amostras essas negativas pelos demais testes (tabela 3).

O teste VIP® para as amostras de presunto fatiado permitiu a detecção de um número inferior ao dos demais testes, permitindo a identificação de 16 (61,5%) das 26 amostras positivas. Nenhuma amostra positiva foi identificada somente pelo VIP® ou somente pelo método clássico (tabela 3).

Pouco mais de 57% das amostras positivas para *Listeria* sp foram identificados pelos quatro testes, simultaneamente (tabela 3).

Tabela 3. Número de amostras positivas para *Listeria* sp dentre as 40 analisadas de presunto fatiado, de acordo com o teste de detecção.

Teste	Número de amostras positivas confirmadas	%
pelo menos um	26	100
clássico	21	80,8
VIA	23	88,5
UNIQUE	22	84,6
VIP	16	61,5
somente clássico	0	-
somente VIA	3	11,5
somente UNIQUE	1	3,8
somente VIP	0	-
clássico e VIA	19	73,1
clássico e UNIQUE	20	76,9
clássico e VIP	16	61,5
clássico, VIA, UNIQUE e VIP	15	57,7
somente VIA e UNIQUE	1	3,8
somente VIA e VIP	0	-
somente UNIQUE e VIP	0	-
somente VIA, UNIQUE e VIP	0	-

Na tabela 4, para as amostras de carne bovina moída, já se verifica um comportamento diferenciado do teste VIP® com relação aos demais. Com seu emprego, detectou-se *Listeria* sp em 38 (97,4%) das 39 amostras positivas examinadas, sendo que cinco amostras positivas só foram identificadas por esse teste.

O teste VIA teve um desempenho muito próximo do clássico, com 29 e 30 amostras positivas, respectivamente. Por outro lado, o teste UNIQUE permitiu a detecção de somente 12 (30,8%) das amostras positivas (tabela 4).

Listeria sp foi detectada pelos quatro testes, simultaneamente, em somente oito (20,5%) amostras.

Tabela 4. Número de amostras positivas para *Listeria* sp dentre as 40 analisadas de carne bovina moída, de acordo com o teste de detecção.

Teste	Número de amostras positivas confirmadas	%
pelo menos um	39	100
clássico	30	76,9
VIA	29	74,4
UNIQUE	12	30,8
VIP	38	37,4
somente clássico	0	-
somente VIA	0	-
somente UNIQUE	0	-
somente VIP	5	12,8
clássico e VIA	27	69,2
clássico e UNIQUE	9	23,1
clássico e VIP	29	74,3
clássico, VIA, UNIQUE e VIP	8	20,5
somente VIA e UNIQUE	0	-
somente VIA e VIP	1	2,6
somente UNIQUE e VIP	1	2,6
somente VIA, UNIQUE e VIP	1	2,6

Pode-se observar, na tabela 5, que o método clássico foi o que propiciou o isolamento de *Listeria* sp de um maior número de amostras de salsicha (13 amostras). Dentre os testes alternativos, o teste VIP[®] apresentou um bom desempenho, permitindo a detecção de 11 (68,8%) amostras positivas, seguido pelo teste VIA (10 amostras positivas).

Para as amostras de salsicha, o teste UNIQUE permitiu a detecção de um menor número de amostras positivas, possibilitando o isolamento de *Listeria* sp de somente 7 (43,8%) das amostras positivas (tabela 5).

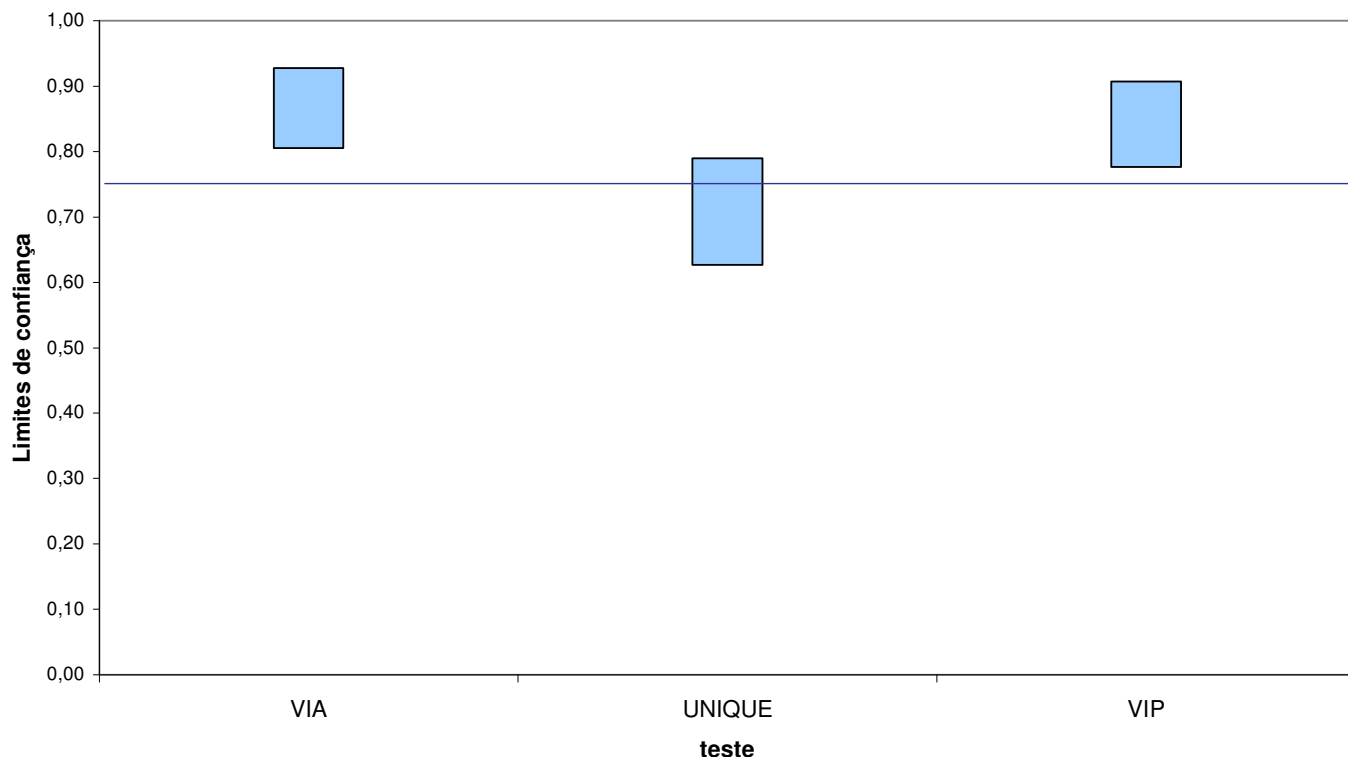
Apenas uma das amostras positivas foi positiva por somente um dos testes alternativos, e seis amostras positivas (37,5%) foram positivas para *Listeria* sp pelos quatro testes, simultaneamente (tabela 5).

Tabela 5. Número de amostras positivas para *Listeria* sp dentre as 40 analisadas de salsicha a granel, de acordo com o teste de detecção.

Teste	Número de amostras positivas confirmadas	%
pelo menos um	16	100
clássico	13	81,3
VIA	10	62,5
UNIQUE	7	43,8
VIP	11	68,8
somente clássico	2	12,5
somente VIA	1	6,3
somente UNIQUE	1	6,3
somente VIP	1	6,3
clássico e VIA	9	56,2
clássico e UNIQUE	6	37,5
clássico e VIP	10	62,5
clássico, VIA, UNIQUE e VIP	6	37,5
somente VIA e UNIQUE	0	-
somente VIA e VIP	0	-
somente UNIQUE e VIP	0	-
somente VIA, UNIQUE e VIP	0	-

Para o estudo da concordância entre os testes alternativos e o clássico, assumiu-se como resultados positivos verdadeiros aqueles apresentados pelo teste clássico de detecção de *Listeria*. Uma vez que se optou por estudar alimentos naturalmente contaminados, não se pode assegurar que *Listeria* sp estivesse presente ou ausente nos alimentos analisados.

Como não existem estabelecidos, na literatura, valores de limites de confiança para se avaliar a correlação de métodos, definiu-se, neste trabalho, que métodos que apresentaram limites de confiança acima de 75% foram considerados como tendo boa correlação.



Outra informação que pode ser derivada desta análise estatística está relacionada à precisão do método. Ela pode ser avaliada pela amplitude do intervalo de confiança, sendo inversamente proporcional a ele.

Figura 10. Limites de confiança para a concordância entre os testes rápidos e o método clássico, para a totalidade das amostras examinadas.

A figura 10 mostra os limites de confiança para a concordância entre cada um dos testes avaliados e o clássico, para a totalidade das amostras examinadas.

Observa-se, nessa figura, que os limites de confiança para a concordância entre os diferentes testes não convencionais e a metodologia clássica variaram entre 62,7 e 92,7%.

O teste UNIQUE foi o que apresentou maior amplitude do intervalo de confiança, o que indica sua menor precisão para as amostras examinadas. Esse

teste também gerou resultados abaixo do limite mínimo de confiança estabelecido.

Estatisticamente, não houve diferença significativa entre o desempenho dos testes VIA e VIP®.

Nas figuras 11, 12 e 13, podem-se observar os limites de confiança para a concordância entre cada um dos testes utilizados e o clássico, para cada tipo de amostra examinada, separadamente.

Na figura 11, pode-se observar que o teste VIA apresentou uma boa correlação com o método clássico, para a análise de carne moída e salsicha, por ter apresentado os limites de confiança acima do limite mínimo estipulado (75%). Para o presunto, seu resultado ficou um pouco abaixo do desejável, com limite mínimo de confiança de 73,9%.

Não se pode dizer que o VIA foi melhor para a carne moída ou para a salsicha, uma vez que os resultados obtidos não podem ser considerados estatisticamente diferentes. Observa-se também que, tanto para a carne moída quanto para a salsicha, a amplitude dos intervalos é a mesma, indicando que os dois testes apresentaram a mesma precisão.

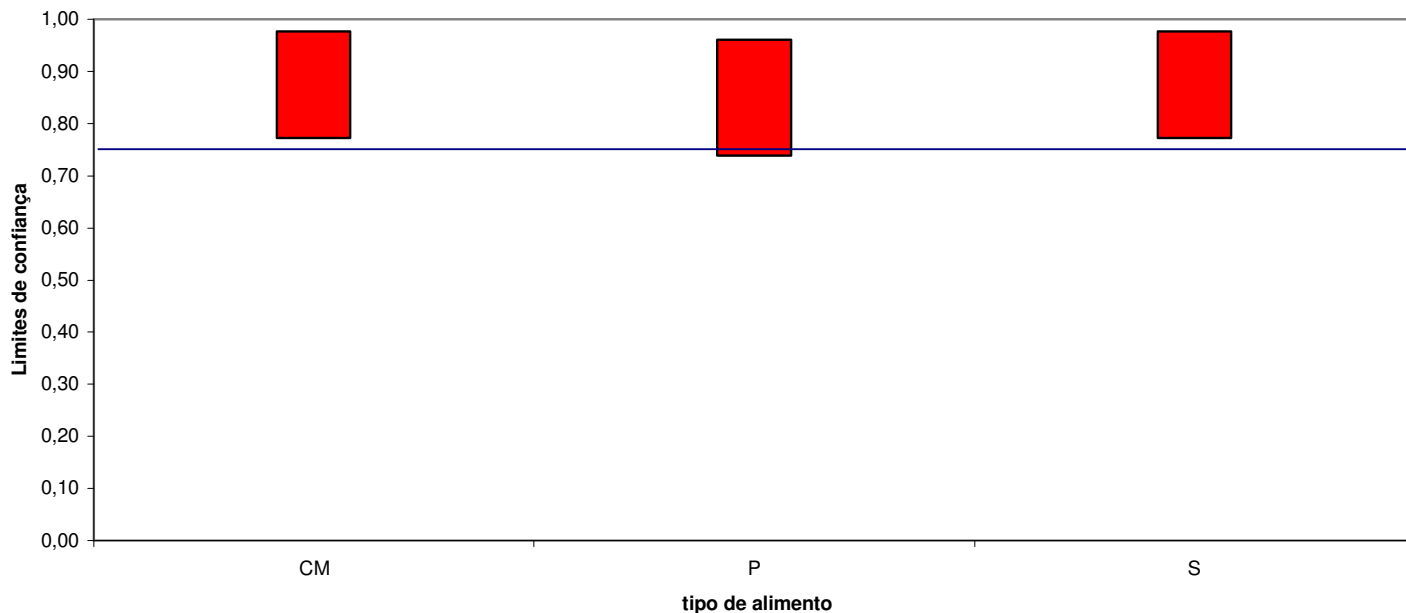


Figura 11. Limites de confiança para a concordância entre o teste VIA e o método clássico, para amostras de carne e seus derivados. CM = carne moída; P = presunto; S = salsicha.

Na figura 12, pode-se observar que o teste rápido UNIQUE (Tecra[®] Diagnostics) teve uma boa correlação com o método clássico somente na análise de presunto fatiado. Esse bom índice de correlação não foi verificado para a carne moída e a salsicha, sendo os limites mínimos de confiança 24,8% e 67,6%, respectivamente.

A amplitude do intervalo de confiança exibido pelo teste UNIQUE variou bastante entre os diferentes tipos de amostra, indicando que sua precisão é muito influenciada pelo alimento.

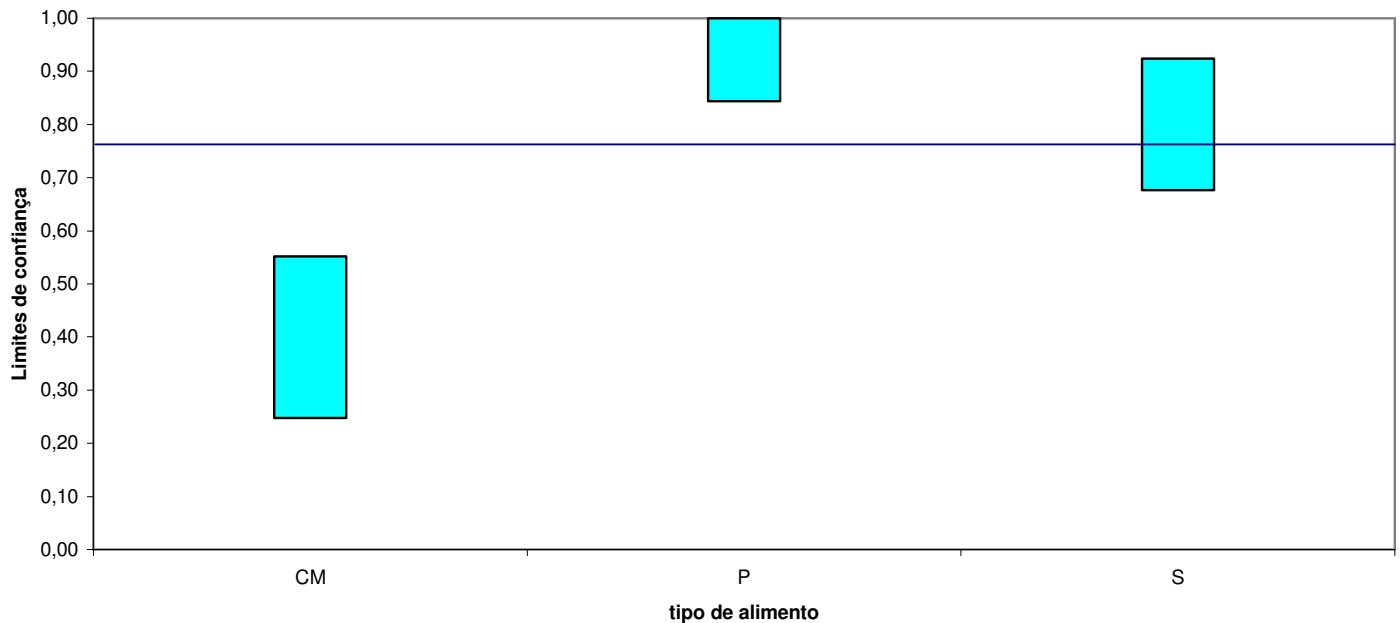


Figura 12. Limites de confiança para a concordância entre o teste UNIQUE e o método clássico, para amostras de carne e seus derivados. CM = carne moída; P = presunto; S = salsicha.

Na figura 13, observa-se que o teste VIP[®] teve uma boa correlação com o clássico, para a análise tanto de amostras de presunto fatiado quanto de salsicha. Neste caso, somente para a carne moída os limites mínimos do intervalo de confiança ficaram abaixo do valor estipulado.

Em relação à precisão, pode-se afirmar que o teste é mais preciso para a análise de amostras de salsicha do que de presunto, pois a amplitude do intervalo de confiança é menor para esse alimento.

Como há uma área de sobreposição entre os intervalos, estatisticamente não há diferença entre os resultados, não se podendo dizer que o teste VIP® tenha sido melhor para a salsicha que para o presunto.

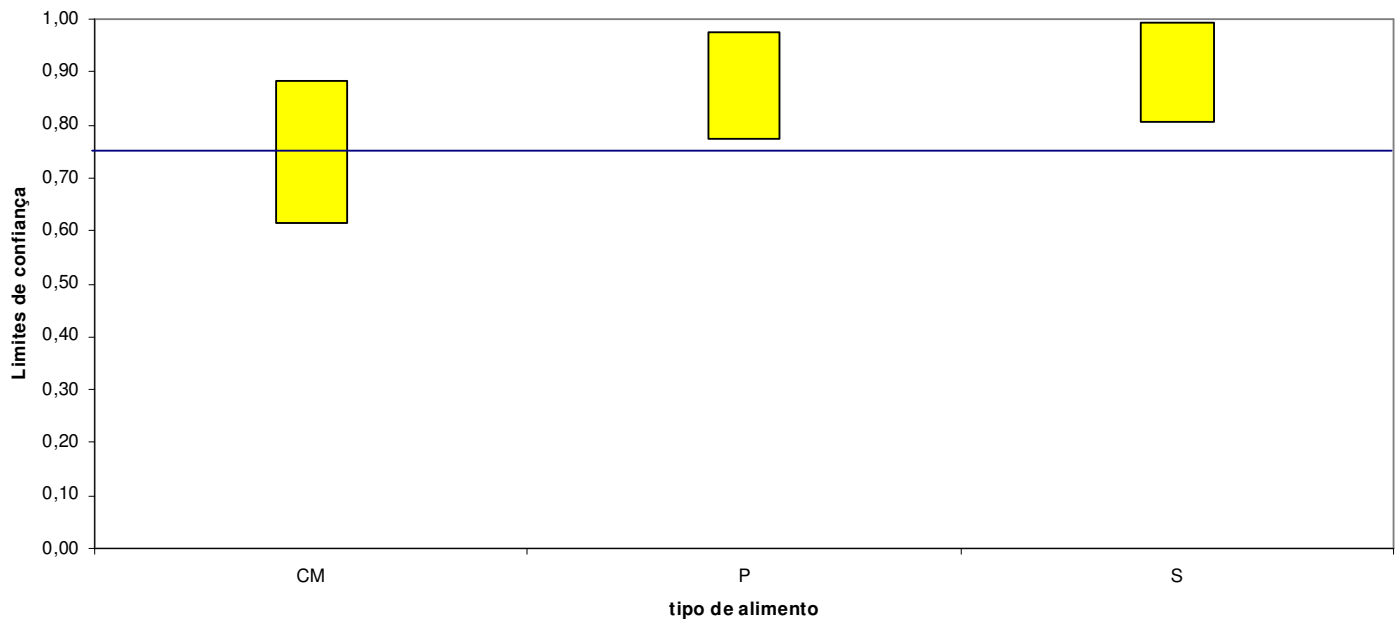


Figura 13. Limites de confiança para a concordância entre o teste VIP® e o clássico, para amostras de carne e seus derivados. CM = carne moída; P = presunto; S = salsicha.

A fim de facilitar a comparação dos resultados obtidos, construiu-se a figura

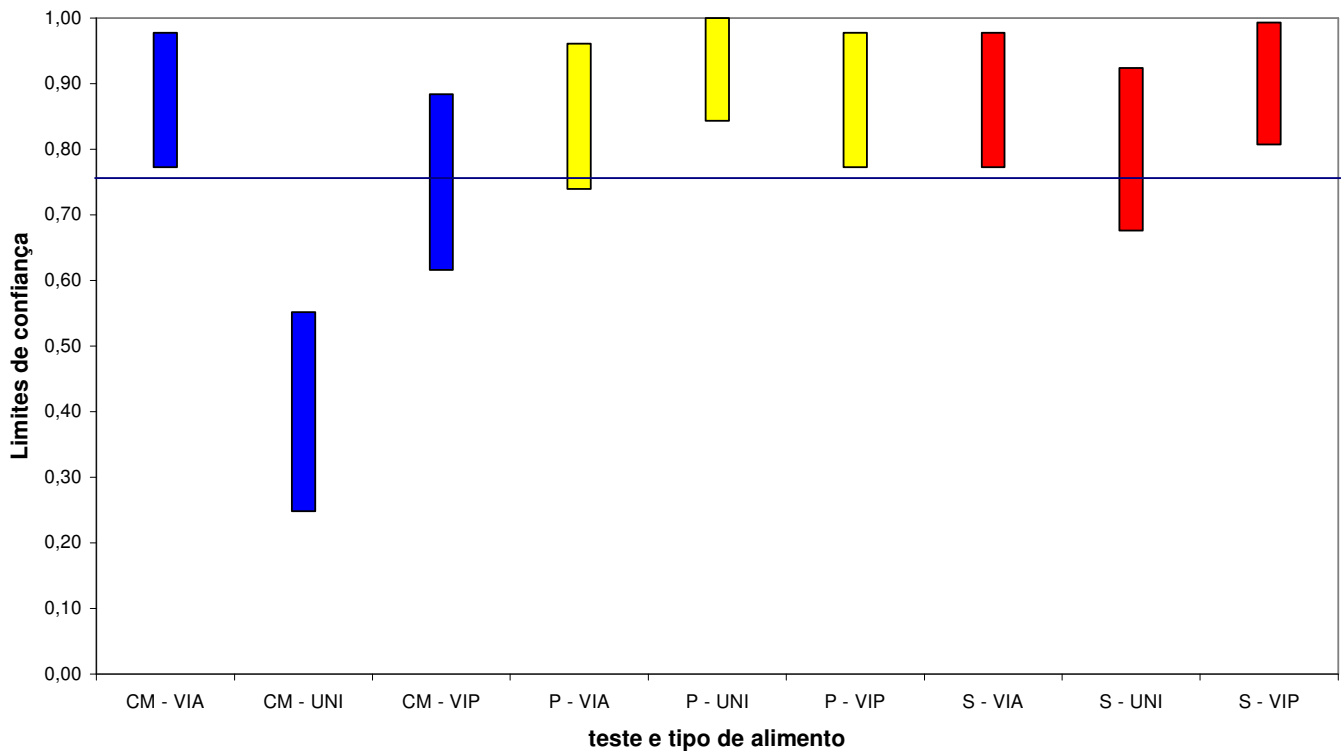


Figura 14. Limites de confiança para a concordância entre os testes utilizados e o clássico, para amostras de carne e seus derivados. VIA = Listeria Visual Immunoassay, da Tecra® Diagnostics; UNIQUE = UNIQUE Listeria, da Tecra® Diagnostics; VIP® = Visual Immunoprecipitate Assay, da BioControl Systems; CM = carne moída; P = presunto; S = salsicha.

Observa-se que a matriz examinada influencia, de maneira geral, o desempenho dos testes. Isto pode ser verificado, principalmente, para as amostras de carne moída, para as quais tanto o UNIQUE como o VIP® apresentaram maior amplitude do intervalo de confiança, indicando a pouca

precisão dos testes para esse tipo de produto alimentício.

Para as amostras de presunto e salsicha, as amplitudes dos intervalos de confiança foram menores.

Os resultados aqui obtidos diferem daqueles de Feldsine et al. (1997), que verificaram ser o VIP[®] mais eficiente para detecção de *Listeria* em produtos cárneos crus que o método clássico empregado (FDA). Pode-se supor que esse fraco desempenho dos testes não convencionais frente às amostras de carne moída seja decorrente da influência da grande variedade de microrganismos da microbiota acompanhante.

São poucos os trabalhos, na literatura, sobre a avaliação da eficiência dos testes não convencionais para detecção de *Listeria* sp, empregados no presente estudo. Por essa razão, apresentam-se, nesta discussão, também os resultados disponíveis para outros microrganismos.

Em 1997, Kerdahi & Istafanos testaram dois testes imunoenzimáticos para detecção de *Listeria* (Tecra Listeria VIA e Vitek Immunodiagnostic Assay System-VIDAS LIS). Foram examinadas 52 amostras de vários alimentos naturalmente contaminados e alimentos inoculados com níveis baixo (2-8 UFC/25g) e alto (11-42 UFC/25g) de *Listeria monocytogenes*. Eles verificaram que os dois testes mostraram 98% de concordância com o método clássico (FDA) e que os testes não convencionais permitiram detectar populações de 1-10 UFC de *Listeria*/25g de diferentes tipos de alimentos.

Istafanos & James (2002) avaliaram o teste VIA para *Listeria*, analisando 74 amostras de alimentos (queijos, frutos do mar e saladas) e comparando os resultados com os obtidos pela análise clássica com semeadura em meio de

cultura cromogênico. Eles encontraram 100% de concordância para os resultados positivos e 98,6% para os negativos.

Flint & Hartley, em 1995, avaliaram a eficiência do teste VIA para *E. coli* O157, analisando alimentos lácteos artificialmente inoculados. Os autores observaram que o VIA foi altamente sensível e que os resultados obtidos foram semelhantes aos do método clássico.

Hughes et al., em 1996, avaliaram o teste Tecra[®] Visual Immunoassay para *Salmonella* (SalVIA) e encontraram 97% de concordância entre os resultados obtidos com esse teste e o método clássico utilizado (FDA).

Em 2002, Salles et al. avaliaram o teste VIA para a pesquisa de *Salmonella*, em carcaças de frangos abatidos, no município de Uberlândia, MG. De 46 amostras analisadas, 11 foram positivas tanto pelo VIA quanto pelo método clássico (APHA). Foi observada uma correlação de 100% entre os métodos.

Jones et al. (1995) analisaram o UNIQUE para *Salmonella* e concluíram que ele é de alta especificidade e sensibilidade. Com o teste, foram detectados os mesmos sorotipos encontrados quando se empregou a metodologia clássica.

Em 2001, Hughes et al. pesquisaram *Salmonella* em 1200 amostras de vários tipos de alimentos e encontraram 592 amostras positivas, empregando o método clássico (Bacteriological Analytical Manual - FDA), e 578 positivas, pelo UNIQUE, que apresentou três resultados falso-positivos e 14 falso-negativos.

Mengoni et al. (2001) avaliaram a eficiência do teste UNIQUE para a *Listeria*, em 20 amostras de queijo e 20 de carne naturalmente contaminadas. Não se observaram resultados falso-positivos ou falso-negativos, e a concordância do UNIQUE com o método clássico utilizado (USDA) foi de 100%.

Ramalho de Paula et al. (2002) avaliaram o desempenho dos testes VIA e UNIQUE para *Salmonella*, em 200 amostras de alimentos crus de origem animal,

verificando que, do total de 45 amostras positivas pra *Salmonella*, 34 (75,6%) foram positivas com o método clássico, 29 (64,4%) foram positivas com o Tecra® *Salmonella* VIA, e 27 (60%), com o Tecra® *Salmonella* UNIQUE. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre o desempenho do método clássico e o dos testes imunoenzimáticos.

Estudos empregando o teste VIP® são ainda mais raros. Feldsine et al. (2000) avaliaram a eficiência do teste VIP® para *Salmonella*, examinando amostras de ovo em pó e alimentos cárneos e lácteos artificialmente inoculados. Os dados obtidos indicaram que os resultados do teste VIP® não diferiram estatisticamente daqueles do método de referência.

Outros testes imunológicos rápidos para detecção de *Listeria* foram avaliados por vários pesquisadores. Em 2000, Gangar et al. avaliaram a eficiência do teste VIDAS LIS (BioMérieux), em 6 tipos de alimentos (natural e artificialmente contaminados). Eles concluíram que o VIDAS LIS é mais eficiente que o método da AOAC, para pesquisa de *Listeria* em sorvetes, e mais eficiente que o método do USDA, para detecção de baixos níveis de *Listeria*, em carne crua de peru. Para os outros alimentos analisados (queijo, vagem, peixe e carne assada), não houve diferença significativa entre os métodos, indicando que eles são equivalentes.

Ainda em 2000, Vaz-Velho et al. avaliaram o teste mini-VIDAS (BioMérieux), para a detecção de *Listeria monocytogenes* na linha de produção de peixe defumado refrigerado. Os autores concluíram que, devido às baixas populações de *L. monocytogenes* e às altas populações da microbiota competitiva encontradas nos produtos, não se pode dizer se o mini-VIDAS pode ser considerado um teste aceitável para a pesquisa de *L. monocytogenes* nos produtos analisados.

Em León, Espanha, Capita et al. (2001) pesquisaram a ocorrência de *Listeria* sp em carne de frango naturalmente contaminada, utilizando o teste imunológico *Listeria* Rapid Test (Oxoid) e o método clássico (USDA). Pôde-se observar que não houve diferença estatística entre os resultados obtidos pelos testes rápido e clássico.

Pelisser et al., em 2001, analisaram 48 amostras de carcaças de frango refrigeradas, utilizando um outro teste imunoenzimático rápido para *Listeria*, o Clearview™ (Oxoid), além do método clássico preconizado pelo FDA. Os autores concluíram que não houve diferença estatística entre os resultados obtidos pelo teste rápido e o método clássico.

Em 2002, Rodrigues et al. avaliaram dois testes rápidos, para a detecção de *Listeria* em uma planta processadora de *nuggets* de frango. Os testes utilizados foram o Clearview™ (Oxoid) e o BAX™ system (Qualicon™), um teste genético baseado na PCR. Os autores concluíram que os dois métodos apresentaram uma excelente especificidade (capacidade de detecção do patógeno procurado, mesmo quando presente em baixo número). O Clearview™ mostrou ser tão bom quanto o método clássico, para a pesquisa de *Listeria*, independentemente do tipo de amostra.

Na figura 15, tem-se um quadro comparativo do tempo necessário para a obtenção de resultados, empregando-se os testes não convencionais estudados e o método clássico, para a detecção de *Listeria* em alimentos.

Quando o caldo de enriquecimento secundário empregado no método convencional é o caldo Fraser, e não ocorre o seu enegrecimento, o resultado da análise é mais rápido e barato que quando se utiliza os testes VIA e VIP® . Entretanto, como muitas vezes se utiliza outros caldos para enriquecimento

secundário que não possuem sistema indicador, ou se emprega a metodologia descrita pelo FDA, a detecção de amostras negativas só ocorrerá após, pelo menos, 72h. Desta forma, o emprego dos testes avaliados torna a análise mais rápida para amostras negativas.

Por outro lado, quando da detecção de amostras positivas por quaisquer um dos testes não convencionais avaliados, esta vantagem deixa de existir, conforme pode ser observado na figura 15. Isso porque, de acordo com as recomendações dos fabricantes, há necessidade de se proceder a confirmação dos resultados obtidos através de metodologias convencionais.

Apesar de fornecer resultados negativos rapidamente (32 horas), o teste UNIQUE gerou uma quantidade muito elevada de resultados presuntivos positivos que não confirmaram a presença de *Listeria* sp (79 testadas/38 negativas). Esses resultados podem ser decorrentes de reações imunológicas não específicas, resultantes da menor especificidade dos anticorpos empregados.

O mesmo tipo de problema foi observado por Ramalho de Paula et al. (2002), que verificaram que, de 47 amostras com resultado positivo pelo teste UNIQUE, somente 27 (57,4%) puderam ser confirmadas como positivas para *Salmonella*. Isso dificulta o trabalho do analista, obrigando a sementeira das amostras suspeitas e identificação das cepas isoladas, levando à retenção dos lotes por tempo mais longo.

Os testes Tecra[®] *Listeria* VIA e Biocontrol VIP[®] para *Listeria*, por outro lado, foram mais eficientes, gerando um menor número de resultados positivos falsos, além de serem de simples execução.

Como desvantagem no emprego dos testes avaliados, pode-se considerar o fato de eles fornecerem resultados no nível de gênero. Considerando-se que *Listeria monocytogenes*, a única espécie reconhecidamente patogênica para

humanos (Rocourt, 1999), nem sempre é encontrada, muitos alimentos são reprocessados ou descartados desnecessariamente, podendo não apresentar risco à saúde do consumidor. Por outro lado, sabe-se que os meios de cultura empregados no enriquecimento seletivo das amostras de alimento propiciam uma melhor multiplicação de *Listeria innocua*, em detrimento de *L. monocytogenes* (Capella et al., 2001), podendo ou não levar ao não isolamento de *L. monocytogenes*, mesmo que a espécie esteja presente.

A implementação de boas práticas de fabricação e programas de análise de risco e ponto crítico de controle (HACCP) têm reduzido os problemas de contaminação de alimentos com *Listeria* (Ryser e Donnelly, 2001). Para auxiliar as indústrias de alimentos, nesses programas, um teste rápido com um bom desempenho é mais indicado que o método clássico, considerando-se o fluxo de trabalho, o tempo de armazenagem e a liberação dos lotes (Salles et al., 2002).

Os testes comercializados específicos para *Listeria monocytogenes* apresentam uma vantagem 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 por *L. monocytogenes*. O ideal seria o desenvolvimento de mais testes rápidos que pudessem detectar apenas *Listeria monocytogenes* (Rocourt, 1999).

O desenvolvimento de um teste rápido que apresente o resultado em um curto período de tempo, que seja simples, sensível e preciso e que não seja caro seria ideal. Entretanto, até agora, alguns desses atributos desejados excluem outros. Por exemplo, se um teste é muito sensível acaba tendo sua precisão diminuída (Rocourt, 1999). Os testes rápidos existentes também necessitam de

pré-enriquecimento da amostra, o que leva a um gasto de tempo de 24 ou até 48 horas. Um teste que não necessitasse dessa etapa também seria conveniente.

5. CONCLUSÕES

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

- os testes VIA e VIP[®] são de fácil execução e rápidos, além de apresentarem desempenho comparável ao do método clássico;

- o teste UNIQUE, apesar de bom desempenho para amostras de presunto, gera um número elevado de resultados positivos falsos, o que dificulta seu emprego.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAEK, S.Y.; LIM, S.Y.; LEE, D.H.; MIN, K.H.; KIM, C.M. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* from domestic and imported foods in Korea. **J. Food Prot.**, v.63, n.2, p. 186-9, 2000.
- BARBUTI, S.; MERCADANTI, I.; MUTTI, P.; QUINTAVALLA, S. Determinazione rapida di *Listeria monocytogenes* in prodotti carnei: valutazione del metodo Gene-track®. **Ind. Cons.**, v.75, p. 3-11, 2000.
- BEAN, N.H.; GRIFFIN, P.M.; GOULDING, J.S.; IVEY, C.B. Foodborne disease outbreaks, 5-year summary, 1983-1987. **J. Food Prot.**, v.53, p. 711-28, 1990.
- BOER, E.; BEUMER, R.R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **Int. J. Food Microbiol.**, v.50, p. 119-30, 1999.
- CANDRIAN, U. Polymerase chain reaction in food microbiology. **J. Microbiol. Meth.**, v.23, n.1, p.89-103, 1995.
- CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.; MOENO, B.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, M.C. Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 65, p.75-82, 2001.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC) Multistate outbreak of listeriosis – United States. Disponível em <http://www.cdc.gov/epo/mmwr/preview/mmwrhtml/00056024.htm> [1998, December, 25]
- CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC) Multistate outbreak of listeriosis – United States. Disponível em: <http://www.cdc.gov/od/oc/media/pressrel/r990114.htm> [1999, March 17]
- CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC) Multistate outbreak of listeriosis – United States. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4950a1.htm> [2000, December 22]

De acordo com a NBR6023/2000 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 2001.

- CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC) Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese – United States. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5026a3.htm> [2001, July 6]
- CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC) Outbreak of listeriosis – United States. Disponível em <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5142a3.htm> [2002, October 25]
- CHOI, Y.C.; CHO, S.Y.; PARK, B.K.; CHUNG, D.H.; OH, D.H. Incidence and characterization of *Listeria* sp. from foods available in Korea. **J. Food Prot.**, v. 64, n. 4, p. 554-8, 2001.
- CURIALE, M.S.; LEWUS, C. Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. **J. Food Prot.**, v.57, p. 1048-51, 1994.
- DALTON, C.B.; AUSTIN, C.C.; SOBEL, J.; HAYES, P.S.; BIBB, W.F.; GRAVES, L.M.; SWAMINATHAN, B.; PROCTOR, M.E.; GRIFFIN, P.M. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes*. **N. Engl. J. Med.**, v.336, p.100, 1997.
- DESTRO, M.T.; SERRANO, A.M.; KABUKI, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, v.4, p.110-112, 1991.
- 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.**, v. 49, p. 151-9, 1999.
- DUH, Y.H.; SCHAFFNER, D.W. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, v. 56, p.205-10, 1993.
- FDA. Triunfo Import Food Corp. Recalls Queijo tipo Mineiro Cheese – United States. Disponível em: http://fda.gov/oc/po/firmrecalls/triunfo10_03.html [2003, October 29].
- FAO. Statistical Information on Food-borne disease in Europe – Microbiological and Chemical Hazrds. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/meeting/004/x6865e.htm>.
- FELDSINE, P.T.; LIENAU, A.H.; FORGEY, R.L.; CALHOON, R.D. Visual Immunoprecipitate Assay (VIP) for *Listeria monocytogenes* and related *Listeria* species detection in selcted foods: Collaborative Study. **J. AOAC Int.**, v.80, n.4. p.791-804, 1997.

- FELDSINE, P.T.; MUI, L.A.; FORGEY, R.L.; KERR, D.E. Equivalence of Visual Immunoprecipitate Assay (VIP®) for *Salmonella* for the detection of motile and nonmotile *Salmonella* in all foods to AOAC culture method: Collaborative study. **J. AOAC Int.**, v.83, n.4, p.888-902, 2000.
- FLINT, S.H.; HARTLEY, N.J. Evaluation of the TECRA *Escherichia coli* O157 Visual Immunoassay for tests on dairy products. **Lett. Appl. Microbiol.** v.21, p.79-82, 1995.
- FRANCO, B.D.G.M. **Métodos rápidos de análise microbiológica de alimentos: estudo crítico e avaliação de novas metodologias.** São Paulo, 1994. Tese de Livre-Docência – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Editora Atheneu, 1996. 182p.
- GANGAR, V.; CURIALE, M.S.; D'ONORIO, A.; SCHHULTZ, A. VIDAS® Enzyme-Linked Immunofluorescent Assay for detection of *Listeria* in foods: Collaborative study. **J. AOAC Int.**, v.83, n.4, p.903-918, 2000.
- GERNER-SMIDT, P.; BRUUN, B. FUSSING, V.; ENGBERG, J.; PETERSEN, A.M.; SCHIELLERUP, J. Listeriosis in Denmark 1998 - 2000. Clinical and epidemiological aspects. In: ISOPOL, 14, Mannheim, 2001. **Resumos.** Alemanha, p.163.
- HEALTH CANADA. Listeriosis: British Columbia – Canadá. Disponível em: http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/bid-bmi/dsd-dsm/nb-ab/2002/nb0802_e.html [2003, October 23]
- HENSYL, W.R. (ed.). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** Williams & Wilkins, 9th ed, 1994.
- HUGHES, D.; DAILIANTS, A.; ASH, M. Comparison of Modified TECRA Visual Immunoassay with AOAC method 989.14 and reference culture methods 967.25-967.28 for detection of *Salmonella* in foods and related samples. **J. AOAC Int.**, v.79, n.6, p.1344-1359, 1996.
- HUGHES, D.; DAILIANIS, A.E.; HILL, L. TECRA® Unique Test for rapid detection of *Salmonella* in food: Collaborative study. **J. AOAC Int.**, v.84, n.2, p.416-29, 2001.

- ICMSF. Microorganisms in foods 5. In: **Microbiological specifications of food pathogens**. London: Blakel Academic & Professional, 1996. 513p.
- 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. Prob.**, v.15, p.275-80, 2001.
- ISTAFANOS, P.; JAMES, L. Comparison of Visual Immunoassay and chromogenic culture medium for the presence of *Listeria* spp. in foods. **J. AOAC Int.**, v.85, n.5, p.1201-1203, 2002.
- JONES, K.L.; MACPHEE, S.; TURNER, A.; BETTS, R.P. An evaluation of the Tecra Unique *Salmonella* test for the detection of *Salmonella* from foods. Comunicação técnica - Campden & Chorleywood Food Research Association.
- JUNTTILA, J. NIEMALÄ, S.I.; HIRN, J. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. **J. Appl. Bacteriol.**, v.65, p.321-7, 1988.
- KERDAHI, K.F.; ISTAFANOS, P.F. Comparative study of colorimetric and fully automated Enzyme-Linked Immunoassay System for rapid screening of *Listeria* spp. in foods. **J. AOAC Int.**, v.80, n.5, p.1139-1142, 1997.
- KNIGHT, M.T.; NEWMAN, M.C.; BENZINGER, M.J.; AGIN, J.R. TECRA *Listeria* Visual Immunoassay (TLVIA) for detection of *Listeria* in foods: Collaborative Study. **J. AOAC Int.**, v.79, n.5, p.1083-94, 1996.
- LILLIE, A.; JACOBSEN, M. Testing of an "ELISA" kit for demonstration of *Listeria* in dairy samples. Comunicação técnica - TECRA® Diagnostics.
- LOU, Y.; YOUSEF, A.E. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. New York: Marcel Dekker, 1999. 738p.
- 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.**, v.34, p. 15-9, 1996.
- MAIJALA, R.; LYYTIKAINEN, O.; JOHANSSON, T. Exposure of *Listeria monocytogenes* in an outbreak caused by butter. In: ISOPOL, 14, Mannheim, 2001. **Resumos**. Alemanha, p.165.
- MENGONI, G.; FORMENTI, L.; PELLON, H. Eficiência Del Test Unique™ *Listeria* como método de diagnóstico rápido para la detección de *Listeria monocytogenes* em alimentos. **Aliment. Latin.**, v.237, p.68-72, 2001.

- MESQUITA, A.J. Bactérias do gênero *Listeria* em carne e água residuária de lavagem de carcaça de um matadouro frigorífico e em carne bovina moída comercializada na cidade de Goiania, Goiás. São Paulo, 1991. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo.
- NORMAN, G.R.; STREINER, D.L. **Bioestatistics – The base essentials**. St. Louis: Mosby-year Book, 1994. 260p.
- OTERO, A.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L.; MORENO, B. Rapid microbiological methods in meat and meat products. **Meat Sci.**, v.49, n.1, p.179-189, 1998.
- 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>
- PELISSER, M.R.; MENDES, S.D.C.; SUTHERLAND, A.D.; BATISTA, C.R.V. Detection of *Listeria* species in refrigerated chicken carcasses using Clearview® and a modified conventional culture method. **Braz. J. Microbiol.**, v.32, n.2, p.113-116, 2001.
- PENG, H.; SHELEF, L.A. Rapid detection of low levels of *Listeria* in foods and next-day confirmation of *L. monocytogenes*. **J. Microbiol. Meth.**, v.41, p.113-20, 2000.
- PETTRAN, R.L.; SWANSON, K.M.J. Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. **J. Food Prot.**, v.7, p.616-8, 1993.
- POPPE, C.; DUNCAN, C.L. Comparison of detection of *Salmonella* by the TECRA UNIQUE *Salmonella* test and the modified Rappaport Vassiliadis medium. **Food Microbiol.**, v.13, p.75-81, 1996.
- RAMALHO DE PAULA, A.M.; GELLI, D.S.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M. Detection of *Salmonella* in foods using Tecra *Salmonella* VIA and Tecra *Salmonella* UNIQUE rapid immunoassays and a cultural procedure. **J. Food Prot.**, v.65, n.3, p.552-555, 2002.
- ROBISON, B.J. Immunodiagnosics in the detection of foodborne pathogens In: TORTORELLO, M.L.; GENDEL, S.M. **Food Microbiological Analysis**. New York: Marcel Dekker, 1997, p. 69-89.
- 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**. 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.**, v.48, p.275-278, 2002.

- RYSER, E. T.; DONNELLY, C. W. *Listeria*. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: Edward Brothers, 2001. p. 343-353.
- SALAMINA, G.; DONNE, E.D.; NICCOLINI, A.; PODA, G.; CESARONI, D.; BUCCI, M.; FINI, R.; MALDINI, M.; SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BIBB, W.; ROCOURT, J.; BINKIN, N.; SALMOSO, S. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. **Epidemiol. Infect.**, v.117, p.429-436, 1996.
- SALLES, M.A.F.; SILVA, P.K.S.; FONSECA, V.R.S.; CARNEIRO, A.L.; BRANCO, F.R.; SILVA, P.L.; ALVES, N.F.; CUNHA, A.P. Pesquisa de *Salmonella* sp através de provas de triagem rápida e convencional, em carcaças de frangos abatidos no município de Uberlândia, MG. **Hig. Aliment.**, v. 16, p.36-40, 2002.
- SCHLECH, W.F.; LAVIGNE, P.M.; BORTOLUSSI, R.A.; ALLEN, A.C.; HALDANE, E.V.; WORT, A.J.; HIGHTOWER, A.W.; JOHNSON, S.E.; KING, S.H.; NICHOLLS, E.S.; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis – Evidence for transmission by food. **New Eng. J. Med.**, v.308, n.4, p. 203-8, 1983.
- SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. Listeriosis in Humans. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. New York: Marcel Dekker, 1999, p. 75-96.
- SUTHERLAND, P.S. Evaluation of an enzyme immunoassay method for the detection of *Listeria* sp. in dairy and environmental samples. Comunicação técnica - TECRA® Diagnostics.
- THAM, W.; ERICSSON, H.; HELMERSSON, S.; NETTERBY, T.; UNNERSTAD, H. DANIELSSON-THAM, M.L. Vacuum packed gravad or cold-smoked rainbow trout / salmon once more the cause of an outbreak of listeriosis? In: ISOPOL, 14, Mannheim, 2001. **Resumos**. Alemanha, p.168.
- TOMPKIN, R.B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **J. Food Prot.**, v.65, n.4, p.709-725, 2002.
- VAILLANT, V.; VALK, H.; ROCOURT, J.; STAINER, F.; PIERRE, O.; GOULET, V. Two consecutive nationwide outbreaks of Listeriosis, France, october 1999 - february 2000. In: ISOPOL, 14, Mannheim, 2001. **Resumos**. Alemanha, p.171.
- VAZ-VELHO, M.; DUARTE, G.; GIBBS, P. Evaluation of mini-VIDAS rapid test for detection of *Listeria monocytogenes* from production lines of fresh to cold-smoked fish. **J. Microbiol. Meth.**, v.40, p.147-51, 2000.
- WALKER, S.J.; STRINGER, M.F. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* at chill temperatures. **J. Appl. Bacteriol.**, v.63, p.20-3, 1987.

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