



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

KAREN VANESSA MUNIVE NÚÑEZ

**OCORRÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO, E
SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE *Listeria
monocytogenes* EM PRODUTOS DERIVADOS DE FRUTAS**

CAMPINAS- SP

2017

KAREN VANESSA MUNIVE NÚÑEZ

**OCORRÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO, E
SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE *Listeria monocytogenes* EM
PRODUTOS DERIVADOS DE FRUTAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientadora: PROF. DRA. DIRCE YORIKA KABUKI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA KAREN VANESSA MUNIVE NÚÑEZ E ORIENTADA PELA PROF^a. DR^a. DIRCE YORIKA KABUKI

CAMPINAS-SP

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 132974/2015-0

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

M925o Munive Núñez, Karen Vanessa, 1989-
Ocorrência, caracterização do perfil genético, e susceptibilidade aos antimicrobianos de *Listeria monocytogenes* em produtos derivados de frutas / Karen Vanessa Munive Núñez. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Dirce Yorika Kabuki.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Listeria monocytogenes*. 2. Frutas minimamente processadas. 3. Melão. 4. Reação em cadeia da polimerase. 5. Susceptibilidade antimicrobiana. I. Kabuki, Dirce Yorika. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Occurrence, characterization of genetic profile and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* in fruits products

Palavras-chave em inglês:

Listeria monocytogenes

Minimally processed fruits

Melon

Polymerase chain reaction

Antimicrobial susceptibility

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Dirce Yorika Kabuki [Orientador]

Aline Crucello

Ana Lucia Penteado

Data de defesa: 29-09-2017

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

Profa. Dra. Dirce Yorika Kabuki
Orientadora
DCA - FEA / UNICAMP

Profa. Dra. Aline Crucello
Titular
DCA - FEA / UNICAMP

Dra. Ana Lucia Penteado
Titular
EMBRAPA - Jaguariúna

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedicado aos meus pais, Nicolás e Mirtha, por todo o carinho e amor que me brindaram e que a pesar da distância sempre me apoiaram e acreditaram na realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada e me deu forças para completar esta etapa da minha vida, ele é o maior mestre que alguém pode conhecer.

Agradeço à **Profa. Dra. Dirce Yorika Kabuki**, pela paciência na orientação, dedicação, e confiança que tornaram possível a realização deste trabalho. Sinceramente muito grata por todo o apoio.

Aos meus pais **Nicolás e Mirtha**, pelo carinho e amor incondicional que sempre me manifestaram, vocês são o maior incentivo que me faz seguir em frente, e a pesar da distância sempre estão presentes em cada passo que dou na minha vida.

À minha irmã **Johanna**, companheira de aventuras e sonhos, você é uma benção na minha vida e aos meus irmãos **Roberto e Frank**, obrigada pelo carinho que me deram sempre e pelas lindas sobrinhas que tenho **Thaira e Allisson**.

Ao meu avô **Isidro** (*in memoriam*), tenho a certeza de que você sente orgulho e está cuidando de mim, e à minha avó **Luisa** pela motivação e amor que me deu em todos os momentos.

Aos meus amigos do laboratório de Microbiologia de alimentos, especialmente à **Juliana Carusi, Taisa Pires e Caio Tadashi** que estiveram presentes sempre que precisei me ajudando e apoiando na pesquisa, e também a **Gabriela, Vanessa e Murilo** que me aconselharam e torceram por mim para a conclusão deste trabalho. Sentirei muito a falta de vocês.

Aos **membros da banca examinadora** pela consideração e disponibilidade para as correções deste trabalho. Muito obrigada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – **CNPq**, pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização desta pesquisa.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos.

É difícil falar de todos, mas nunca esquecerei de todos aqueles que me apoiaram, me ouviram e me ajudaram durante todo este tempo de mestrado. Muito obrigada!

*Foi o tempo que dedicaste a tua rosa
que fez a tua rosa tão importante.*

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Listeria monocytogenes é um patógeno alimentar psicotrófico, presente em diversos tipos de alimentos e pode causar doença severa com alto índice de mortalidade. As frutas são susceptíveis de serem contaminadas com micro-organismos e a ocorrência depende do tipo de fruta e das condições de crescimento e colheita. Nos Estados Unidos da América e Europa, as frutas têm sido reconhecidas como responsáveis por surtos de listeriose, mas no Brasil, a listeriose é desconhecida pela maioria da população e poucos estudos sobre a ocorrência e multiplicação de *L. monocytogenes* em frutas têm sido relatados. Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a ocorrência de *L. monocytogenes* em polpas de frutas congeladas e frutas minimamente processadas, caracterizar o perfil genético dos isolados de *L. monocytogenes* mediante a detecção dos genes de virulência *inIA*, *inIB*, *plcA*, *plcB*, *prfA* e *actA* por PCR convencional, e analisar o perfil de susceptibilidade dos isolados aos antimicrobianos: ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina, ceftriaxona, cefalotina, cloranfenicol, tetraciclina, penicilina G e sulfametoxazol/trimetoprim pelo método de disco difusão em ágar. Foi analisado um total de 160 amostras (80 de polpas de frutas congeladas e 80 de frutas minimamente processadas), utilizando-se a metodologia proposta pelo “Health Protection Branch” do Canadá. *Listeria* spp. não foi isolada de polpas de frutas congeladas. Nas amostras de frutas minimamente processadas foi encontrada *Listeria* sp. em 5% (4/80) das amostras, sendo: uma amostra de coco ralado, uma de seleta de frutas, uma de melão Orange e uma de melão Gália. A espécie *L. monocytogenes* foi identificada mediante ensaio da PCR do gene *hlyA* e a espécie foi confirmada em uma amostra de melão Gália e uma de melão Orange. Na pesquisa dos genes de virulência, 100% (9/9) dos isolados apresentaram resultados positivos para os genes *inIA*, *inIB*, *plcA*, *plcB*, *prfA* e *actA*, apresentando este último gene um polimorfismo alélico que o caracteriza como tipo alélico 3 de *actA*. Quanto à resistência aos antimicrobianos, 100% (9/9) dos isolados de *L. monocytogenes* apresentaram susceptibilidade a 6 dos 9 antibióticos testados. Tais agentes antimicrobianos foram: ampicilina, ciprofloxacina, tetraciclina, cefalotina, cloranfenicol e sulfametoxazol/trimetoprim. Todos os isolados apresentaram resistência apenas à ceftriaxona (100%) e nenhuma cepa apresentou

multirresistência. O presente trabalho evidencia que o melão constitui uma potencial fonte de transmissão de *L. monocytogenes*, deste modo é importante o controle rigoroso durante a produção de frutas minimamente processadas, para que este patógeno não represente um risco para a saúde pública.

PALAVRAS CHAVE: *Listeria monocytogenes*, frutas minimamente processadas, melão, PCR, susceptibilidade antimicrobiana.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a psychotropic food pathogen, present in several types of food and can cause severe disease with high mortality rate. Fruits are contaminated with microorganisms and the occurrence depends on the type of fruit and growth and harvest conditions. In the United States and Europe, fruits have been recognized as responsible for outbreaks of listeriosis, but in Brazil, listeriosis is unknown by most of people and few studies on the occurrence and multiplication of *L. monocytogenes* in fruits have been reported. Thus, the objectives of this work were to evaluate the occurrence of *L. monocytogenes* in frozen fruit pulps and minimally processed fruits, to characterize the genetic profile of *L. monocytogenes* isolates by detecting the virulence genes *inlA*, *inlB*, *plcA*, *plcB*, *prfA* and *actA* by conventional PCR, and to analyze the susceptibility profile of the isolates to antimicrobial agents: ampicillin, ciprofloxacin, gentamicin, ceftriaxone, cephalothin, chloramphenicol, tetracycline, penicillin G and sulfamethoxazole / trimethoprim by the disk diffusion method. A total of 160 samples was analyzed (80 of frozen fruit pulps and 80 of minimally processed fruits), using the methodology proposed by the "Health Protection Branch of Canada". *Listeria* spp. was not isolated from frozen fruit pulps. Among the of minimally processed fruits, *Listeria* sp. was found in 5% (4/80) of the samples corresponding to one sample of grated coconut, one fruit salad, one Orange melon and one Galia melon. *L. monocytogenes* was identified by PCR assay for gene *hlyA* and the species was confirmed in a sample one Galia melon and one of Orange melon. In the study of virulence genes, 100% (9/9) of the isolates presented positive results for the genes *inlA*, *inlB*, *plcA*, *plcB*, *prfA* and *actA*. The gene *actA* was characterized as allelic type 3. Regarding to antimicrobial resistance, 100% (9/9) of the *L. monocytogenes* isolates showed susceptibility to 6 of the 9 antibiotics tested. Such antimicrobial agents were: ampicillin, ciprofloxacin, tetracycline, cephalothin, chloramphenicol and sulfamethoxazole / trimethoprim. All isolates presented resistance to ceftriaxone (100%) and none of isolates presented multi-resistance. The present work shows that melon constitutes a potential source of transmission of *L. monocytogenes*, therefore, strict control during the production of minimally processed fruits is important, so that this pathogen does not present a risk to public health.

KEY-WORDS: *Listeria monocytogenes*, fruit pulps, minimally processed fruits, melon, PCR, antimicrobial susceptibility.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características diferenciais das principais espécies do gênero <i>Listeria</i>	27
Tabela 2.	Principais proteínas de virulência em <i>L. monocytogenes</i>	31
Tabela 3.	Primers utilizados na identificação de <i>L. monocytogenes</i>	49
Tabela 4.	Primers utilizados para a determinação dos genes de virulência <i>inIA</i> , <i>inIB</i> , <i>plcA</i> , <i>plcB</i> , <i>prfA</i> e <i>actA</i>	50
Tabela 5.	Ciclos de amplificação de PCR para a determinação dos genes de virulência <i>inIA</i> , <i>inIB</i> , <i>plcA</i> , <i>plcB</i> , <i>prfA</i> e <i>actA</i>	51
Tabela 6.	Medidas dos halos de inibição (mm), segundo o antimicrobiano.....	54
Tabela 7.	Valores médios de pH em polpas de frutas congeladas.....	56
Tabela 8.	Valores médios de pH em frutas minimamente processadas.....	57
Tabela 9.	Número de amostras de polpas de frutas congeladas adquiridas de diferentes marcas comerciais.....	58
Tabela 10.	Número de amostras de frutas minimamente processadas adquiridas nos diferentes estabelecimentos comerciais.....	59
Tabela 11.	Ocorrência de <i>Listeria</i> sp. e <i>L. monocytogenes</i> em polpas de frutas congeladas e frutas minimamente processadas.....	62
Tabela 12.	Características do perfil genético dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> ...	65
Tabela 13.	Perfil de susceptibilidade dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> aos antimicrobianos testados.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fluxograma do processamento de polpas de frutas congeladas.....	22
Figura 2.	Etapas gerais do processamento de frutas minimamente processadas.....	25
Figura 3.	Ciclo de infecção intracelular de <i>Listeria monocytogenes</i>	30
Figura 4.	Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentado a amplificação do gene <i>hlyA</i> com os isolados positivos de <i>L. monocytogenes</i>	60
Figura 5.	Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentado a amplificação do gene <i>inlA</i> com os isolados positivos de <i>L. monocytogenes</i>	65
Figura 6.	Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentado a amplificação do gene <i>inlB</i> com os isolados positivos de <i>L. monocytogenes</i>	66
Figura 7.	Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentado a amplificação do gene <i>prfA</i> com os isolados positivos de <i>L. monocytogenes</i>	66
Figura 8.	Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentado a amplificação do gene <i>plcA</i> com os isolados positivos de <i>L. monocytogenes</i>	66
Figura 9.	Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentado a amplificação do gene <i>plcB</i> com os isolados positivos de <i>L. monocytogenes</i>	67
Figura 10.	Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentado a amplificação do gene <i>actA</i> com os isolados positivos de <i>L. monocytogenes</i>	67
Figura 11.	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos de <i>L. monocytogenes</i> isolada de amostra de Melão Gália minimamente processado.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI - *Brain Heart Infusion*

bp – *Base pair*

CDC - *Centers for Diseases Control and Prevention*

CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute*

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

dNTP – deoxinucleotídeos trifosfato

DTA – Doenças transmitidas por alimentos

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FDA - *Food and Drug Administration*

IAL - Instituto Adolfo Lutz

IFPA - *International Fresh-Cut Producers Association*

IOC - Instituto Oswaldo Cruz

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

PCR – *Polymerase chain reaction*

pH - potencial hidrogeniônico

PRRs - *Proline-rich regions*

SIM – Ágar Sulfeto Indol Motilidade

Taq - *Thermus aquaticus*

TSA - *Trypticase Soy Agar*

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

UV - Ultravioleta

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 Polpas de frutas congeladas	21
3.2 Frutas minimamente processadas	23
3.3 Gênero <i>Listeria</i>	26
3.4 Doenças causadas por <i>L. monocytogenes</i>	28
3.5 Fatores de virulência e patogênese de <i>L. monocytogenes</i>	29
3.6 Sorotipos de <i>L. monocytogenes</i>	34
3.7 Subtipagem de <i>L. monocytogenes</i>	35
3.8 Surtos e casos de listeriose associados às frutas	37
3.9 <i>Listeria</i> em frutas	38
3.9.1 Prevalência em frutas	38
3.9.2 Crescimento e sobrevivência em frutas	40
3.9.3 Sanitização em frutas	42
3.10 Susceptibilidade de <i>Listeria</i> aos antimicrobianos	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Obtenção das amostras	45
4.1.1 Polpa de frutas congeladas analisadas	45
4.1.2 Frutas minimamente processadas analisadas	45
4.2 Determinação do pH	45
4.3 Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	46

4.3.1	Preparo da amostra e isolamento	46
4.3.2	Seleção e identificação dos isolados	46
4.3.2.1	Provas bioquímicas	47
4.3.2.2	Extração do DNA	48
4.3.2.3	Identificação de <i>L. monocytogenes</i> por PCR	48
4.4	Determinação dos genes de virulência <i>inlA</i> , <i>inlB</i> , <i>plcA</i> , <i>plcB</i> , <i>prfA</i> e <i>actA</i>	49
4.4.1	PCR para genes <i>inlA</i> , <i>inlB</i> , <i>plcA</i> , <i>plcB</i>	51
4.4.2	PCR para gene <i>prfA</i>	51
4.4.3	PCR para gene <i>actA</i>	52
4.5	Susceptibilidade aos antimicrobianos.....	52
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1	Determinação do pH em polpas de frutas congeladas e frutas minimamente processadas	55
5.2	Ocorrência de <i>Listeria</i> sp. e <i>L. monocytogenes</i> produtos de frutas.....	57
5.3	Caracterização dos genes de virulência <i>inlA</i> , <i>inlB</i> , <i>plcA</i> , <i>plcB</i> , <i>prfA</i> e <i>actA</i>	64
5.4	Teste de susceptibilidade de <i>L. monocytogenes</i> aos antimicrobianos.....	69
6.	CONCLUSÕES	75
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1. INTRODUÇÃO

As contínuas mudanças no estilo de vida diminuíram o tempo em que as pessoas estão dispostas a preparar e cozinhar alimentos, portanto a demanda por produtos prontos para consumo tem aumentado. As frutas, as quais são armazenadas durante longos períodos em condições refrigeradas, sem danos, parecem oferecer um grande potencial para o crescimento de agentes patogênicos psicrotróficos. A ocorrência destes micro-organismos em frutas varia conforme o tipo de fruta e das suas condições de cultivo, colheita, armazenagem e manipulação (BELL, 2005).

Embora as frutas sejam alimentos importantes para manter uma alimentação saudável, são suscetíveis à ocorrência de patógenos. Estes alimentos precisam de ótimas condições de refrigeração para garantir a qualidade e estabilidade da vida útil, uma vez que favorecem a multiplicação de psicrotróficos, como *L. monocytogenes*.

Listeria monocytogenes é uma bactéria patogênica de grande preocupação à saúde pública por causar infecções graves, apresentando alta taxa de mortalidade em pessoas imunodeprimidas, idosos e neonatos (DOYLE; BEUCHAT, 2007). A manifestação clínica é descrita de duas formas, a listeriose invasiva e a gastrointestinal (não-invasiva). A listeriose invasiva, a mais severa, é caracterizada pelos casos de aborto, meningite e septicemia em bebês e idosos. A listeriose não invasiva é caracterizada por sintomas semelhantes a uma gripe em gestantes, até uma gastroenterite que normalmente não evolui para óbito (JAY, 2005).

Este patógeno representa um perigo à saúde e está associado a uma variedade de alimentos incluindo as frutas e produtos derivados, os quais mesmo em condições adversas como temperaturas de refrigeração e pH ácido, permitem a sobrevivência e a multiplicação deste micro-organismo. Assim, *Listeria monocytogenes* causa preocupação às indústrias de alimentos e à saúde da população podendo ser encontrado tanto em produtos frescos quanto refrigerados (BEHRING et al., 2003; PENTEADO; LEITÃO, 2004; FLESSA et al., 2005; DOYLE; BEUCHAT, 2007).

Quanto maior o uso indiscriminado de antibióticos para o tratamento da listeriose, maior é a preocupação pelo aumento de cepas resistentes. Para o tratamento da listeriose é utilizado uma variedade de antibióticos, no entanto, o resultado da eficiência do antibiótico depende do estado de saúde do paciente e sua idade.

Os avanços nas técnicas moleculares têm assegurado resultados mais rápidos e precisos para a obtenção de dados relacionados aos micro-organismos, no que se refere ao entendimento do seu comportamento, sua ecologia e biologia, fatores de virulência, diferenças genotípicas e fenotípicas como também para o diagnóstico do patógeno e sua prevenção (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Até poucos anos atrás, os surtos de listeriose nos Estados Unidos e na Europa estavam amplamente associados ao consumo de produtos lácteos e carnes. No entanto, recentemente têm sido relatados casos de listerioses associadas às frutas e vegetais. No Brasil, são poucas as investigações de surtos, sendo a doença normalmente subdiagnosticada e subnotificada, existindo uma deficiência na caracterização dos agentes responsáveis pela doença (DESTRO, 2006; RIBEIRO et al., 2016). Assim também, são poucos os estudos sobre a ocorrência de *Listeria* spp. em frutas, não existem relatos de surtos envolvendo o patógeno e a legislação brasileira não estabelece um padrão para *L. monocytogenes* em frutas.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo principal avaliar a ocorrência, caracterizar o perfil patogênico, e a susceptibilidade antimicrobiana de *L. monocytogenes* em produtos derivados de frutas, uma vez que o aumento do consumo destes produtos tem sido observado, e especialmente porque o Brasil é um grande produtor mundial de frutas e vegetais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho objetiva avaliar a ocorrência, verificar o perfil genético, e a susceptibilidade antimicrobiana de *Listeria monocytogenes* em produtos derivados de frutas.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a ocorrência de *L. monocytogenes* em polpas de frutas congeladas e frutas minimamente processadas.
- Detectar a presença dos genes de virulência *inlA*, *inlB*, *plcA*, *plcB*, *prfA* e *actA* por PCR convencional nos isolados.
- Avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *L. monocytogenes* pelo método de disco difusão em ágar.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Polpas de frutas congeladas

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a polpa de fruta é um produto não fermentado, não concentrado, não diluído, obtido pelo esmagamento de frutos carnosos mediante um processo tecnológico adequado. O produto não deve conter terra, sujidade, fragmentos de insetos e deve apresentar um teor mínimo de sólidos totais provenientes da parte comestível do fruto. As características físicas, químicas e organolépticas deverão ser as provenientes do fruto de sua origem, levando em consideração os limites mínimos e máximos estabelecidos para cada polpa de fruta de acordo com as normas específicas (BRASIL, 2000).

A polpa de fruta congelada tem uma grande importância como matéria prima, uma vez que, após produzida pode ser armazenada por longos períodos, dessa forma possibilita o consumo de suco de frutas em qualquer época do ano sem depender da sazonalidade da fruta e facilita sua comercialização a longas distâncias, já que, frutas “in natura” se deterioram rapidamente por serem muito perecíveis. Além disso, trazem ao consumidor benefícios como a praticidade no preparo e manuseio do produto. Assim também, com a preocupação da população em manter hábitos mais saudáveis, ocorre um aumento no processo de produção de polpa de fruta tanto no mercado interno como no externo (COSTA et al., 2013).

A qualidade de uma polpa de fruta está relacionada com a preservação dos seus nutrientes e às suas características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais, que devem ser semelhantes a fruta “in natura” para atender as exigências do consumidor e da legislação vigente (DANTAS et al., 2012).

Devido à sua composição, as polpas de frutas propiciam o crescimento de micro-organismos. Embora sejam mais susceptíveis à contaminação por bolores e leveduras, há casos documentados de doenças entéricas causadas por bactérias, vírus e parasitas contaminantes nestes produtos. Portanto, para garantir a segurança do produto é importante o controle rigoroso do processo produtivo e do produto (SEBASTIANY, et al. 2009).

O processamento das polpas de frutas apresenta uma série de etapas para a obtenção de um produto que esteja dentro dos padrões estabelecidos da segurança do alimento. Como toda produção de um produto comestível cada etapa é importante, sendo que as falhas podem comprometer o produto final. O processamento é composto por várias etapas demonstradas na Figura 1.

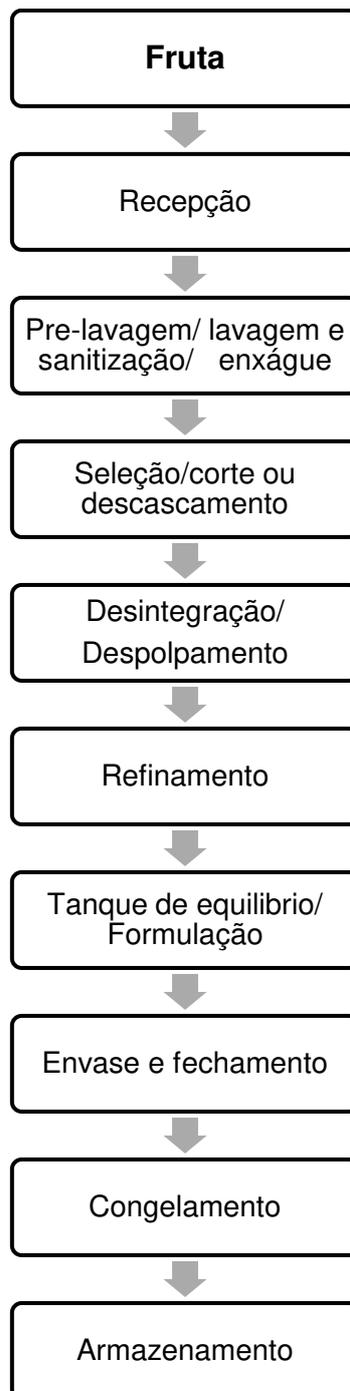


Figura 1. Fluxograma do processamento de polpas de frutas congeladas.
Fonte: TOLENTINO; GOMES, 2009.

As polpas de frutas devem ser submetidas ao congelamento, o que irá retardar qualquer tipo de alteração (química, bioquímica e/ou microbiológica), em temperaturas entre -18°C e -25°C em câmaras frigoríficas. A polpa deve ser mantida congelada até o consumo (EMBRAPA, 2003). Além do congelamento, para a conservação a longo prazo das polpas de frutas, pode ser realizado o tratamento térmico antes do envase, sendo a polpa conduzida para pasteurização ($90^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60$ segundos). Este processo visa eliminar os micro-organismos patogênicos e deteriorantes, e melhora a textura, sabor e a aparência dos alimentos, contudo a maioria das micro e pequenas empresas não realizam este processo devido ao custo elevado dos equipamentos (INTEC, 2005; KOPF, 2008; TOLENTINO; GOMES, 2009).

Segundo a legislação vigente do Ministério da Agricultura para polpas de frutas, os limites máximos microbiológicos fixados para bolores e leveduras são 5×10^3 UFC/g para polpa “in natura”, congelada ou não, e 2×10^3 UFC/g para polpa conservada quimicamente e/ou que sofreu tratamento térmico. Para coliformes fecais o valor máximo é 1/g, e *Salmonella* sp. ausência em 25g (BRASIL, 2000). Não há padrão para *L. monocytogenes*.

3.2 Frutas minimamente processadas

Segundo a *International Fresh-cut Produce Association* (IFPA), produtos minimamente processados podem ser definidos como frutas e hortaliças, ou suas combinações, permanecendo no estado fresco com qualidade e garantia de sanidade. Estes produtos são submetidos a procedimentos como seleção, lavagem, corte ou descasque, disponibilizando um produto com alto valor nutritivo, sabor e conveniência, pronto para o consumo ou de fácil preparo (OLIVEIRA et al. 2015).

No que diz respeito aos aspectos nutricionais, frutas e vegetais minimamente processados, armazenados sob condições apropriadas são uma grande fonte de vitaminas e minerais, trazendo benefícios para todos os sistemas do corpo. O grande problema para esses produtos consiste na carga microbiana em sua superfície (OLIVEIRA et al., 2015).

Produtos como frutas e verduras com processamento mínimo, estão se consolidando e o consumo está crescendo no Brasil. Devido ao crescimento acelerado do consumo de minimamente processados, observa-se o aumento de infecções alimentares associadas ao consumo desses produtos, sendo importantes as avaliações microbiológicas nesses alimentos (SEBRAE, 2008).

A vida de prateleira de frutas minimamente processadas é menor quando comparadas com alimentos “in natura”, devido às operações envolvidas na produção desses produtos como lavagem, descascamento e corte, além de condições específicas para armazenamento e condicionamento. A deterioração surge do resultado das mudanças bioquímicas e fisiológicas, como perda de água, escurecimento dos tecidos, proliferação bacteriana e aumento da atividade respiratória (SEBRAE, 2008; GOYENECHE et al., 2014).

No Brasil, as frutas minimamente processadas não têm uma legislação específica, mas a Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece parâmetros microbiológicos para frutas e hortaliças “in natura”, preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas), sanificadas, refrigeradas ou congeladas para consumo direto e pode ser utilizada como referência para produtos minimamente processados. Esta resolução estabelece como padrão: ausência de *Salmonella* sp. em 25 g de amostra e contagem máxima para coliformes fecais a 45°C de 5×10^2 NMP/g (BRASIL, 2001).

A qualidade e segurança desses produtos são afetadas por muitos micro-organismos, inclusive os patogênicos, que podem fazer parte da microbiota e estão relacionados com o manuseio que ocorre no momento do preparo dos alimentos minimamente processados. Assim, é essencial o controle da temperatura de refrigeração no processamento, uma vez que, diminui o desenvolvimento de micro-organismos deterioradores e patogênicos como *L. monocytogenes*, evitando assim danos à saúde da população e aumentando a vida útil das frutas (TRESSELER et al., 2009; MORETTI, 2007).

Segundo Silva et al. (2011) o processamento de frutas minimamente processadas inclui operações de pós-colheita, seleção, lavagem, descascamento, corte, sanitização, enxágue, centrifugação ou drenagem, seleção final,

acondicionamento e armazenamento, conforme mostrado na Figura 2. Esse fluxograma varia de acordo com as características de cada fruta e seu produto final.

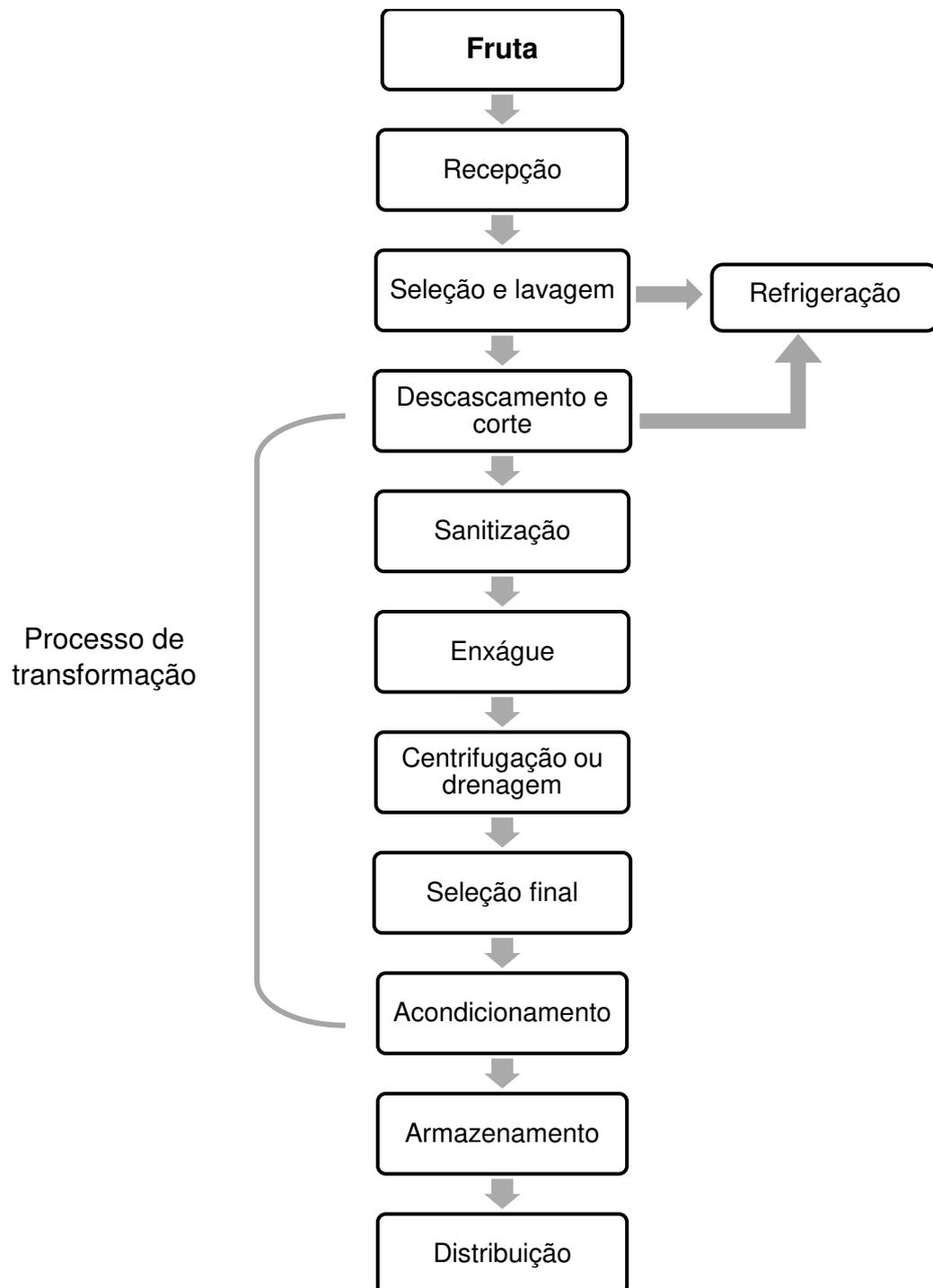


Figura 2. Etapas gerais do processamento de frutas minimamente processadas.
Fonte: SILVA et al., 2011

Algumas frutas, após a etapa de seleção e lavagem são submetidas a sanitização e enxague para minimizar a transferência de micro-organismos, e depois são descascadas e fatiadas e ou somente fatiadas (BASTOS, 2006).

3.3 Gênero *Listeria*

As espécies do gênero *Listeria* são micro-organismos Gram-positivos, em forma de bastonetes curtos, móveis por possuir flagelos peritricos, não formadores de esporos. Possuem metabolismo anaeróbio facultativo, são catalase positiva, oxidase negativa, produzem ácido láctico a partir da glicose e de outros açúcares e hidrolisam a esculina. *Listeria* spp. contêm ácidos teicóico e lipoteicóico e suas colônias brilham quando visualizadas por luz transmitida obliquamente (STACHI, 2007; JAY, 2005).

O gênero *Listeria* atualmente possui 17 espécies reconhecidas, compreendidas por: *L. monocytogenes* (PIRIE, 1940), *L. grayi* (ERREBO LARSEN; SEELIGER, 1966), *L. innocua* (SEELIGER, 1981), *L. seeligeri* e *L. welshimeri* (ROCOURT; GRIMONT, 1983), *L. ivanovii* (SEELIGER et al., 1984); *L. marthii* (GRAVES et al., 2010); *L. rocurtia* (LECLERCQ et al., 2010); *L. weihenstephanensis* (LANG HALTER et al., 2013); *L. fleischmannii* (BERTSCH et al., 2013); *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia* e *L. grandensis* (DEN BAKKER et al., 2014); *L. booriae* e *L. newyorkensis* (WELLER et al., 2015).

Entretanto as mais conhecidas são: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*; *L. innocua*; *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. grayi*. Apenas duas espécies são reconhecidas como patogênicas: *L. monocytogenes*, que pode infectar uma variedade de espécies animais, incluindo humanos e *L. ivanovii*, que possui uma importância epidemiológica restrita aos ruminantes (JAY, 2005).

A identificação das espécies de *Listeria* é baseada em um número limitado de marcadores bioquímicos, entre os quais está a hemólise, usada para diferenciar entre *L. monocytogenes* e a espécie mais frequente não patogênica, *L. innocua*. Os testes bioquímicos úteis para a diferenciação entre as espécies são a produção de ácido a partir de D-xilose, L-ramnose, alfa-metil-D-manósido, e D-manitol (DOYLE; BEUCHAT, 2007) (Tabela 1).

Tabela 1. Características diferenciais das principais espécies do gênero *Listeria*.

Características	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. grayi</i>
Beta-hemólise	+	-	++	-	+	-
Fermentação de açúcares	Ramnose	+	V	-	V	-
	Xilose	-	-	+	+	+
	Manitol	-	-	-	-	+
Catalase	+	+	+	+	+	+

++: usualmente apresentam uma zona mais ampla de hemólise; V: variável

Fonte: modificado de Pagotto et al. (2011)

Em relação a sua temperatura de desenvolvimento, *L. monocytogenes* é reconhecida como um organismo psicotrófico, com crescimento às temperaturas utilizadas em processos de produção de alimentos refrigerados, sendo capaz de crescer em temperaturas entre 0 a 45 °C, apresentando o crescimento mais lento em temperaturas mais baixas. A temperatura ótima para seu crescimento é de aproximadamente 37 °C (BELL et al., 2005; DOYLE; BEUCHAT, 2007).

Embora multipliquem melhor entre pH 6 a 8, o pH mínimo para o crescimento e sobrevivência do micro-organismo tem sido objeto de um grande número de estudos. Em geral, as espécies crescem numa faixa de pH 4,1 a 9,6. (JAY, 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

L. monocytogenes cresce otimamente em atividade de água (A_w) de valores >0,97. Para a maioria das cepas, a A_w mínima para o crescimento é de 0,93, mas algumas cepas podem crescer em A_w de 0,90. Além disso, a bactéria pode sobreviver por longos períodos em A_w de 0,83. *L. monocytogenes* é capaz de crescer na presença de 10 a 12% de cloreto de sódio e pode aumentar a sua população em concentrações moderadas de sal (6,5%) podendo sobreviver por longos períodos em altas concentrações de sal; a sobrevivência em ambientes de alta salinidade é significativamente aumentada pela redução da temperatura (DOYLE; BEUCHAT, 2007).

3.4 Doenças causadas por *L. monocytogenes*

A listeriose é uma doença causada pela ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes*. A manifestação clínica é descrita de duas formas, a listeriose invasiva e a gastrointestinal (não-invasiva). A listeriose invasiva é severa, pois possui uma taxa de mortalidade alta de 20 % a 30 %, principalmente, para pessoas susceptíveis, como gestantes, recém-nascidos, idosos, pacientes submetidos à hemodiálise, terapias prolongadas e indivíduos com sistema imunológico deprimido. Já a listeriose não-invasiva pode causar infecções brandas, semelhantes a uma gripe, até surtos de gastroenterite febril em indivíduos saudáveis, em alguns casos estes sintomas são inaparentes, e normalmente não há óbito (JAY, 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Os sintomas mais comuns da listeriose humana incluem fadiga, calafrios, dores de cabeça, musculares e articulares e também gastroenterite. Mulheres grávidas que contraem a doença podem não apresentar sintomas, mas quando aparecem, são brandos e se assemelham a gripe. A disseminação do transplacentária da mulher para o feto resulta em aborto, parto prematuro, nascimento fetal ou septicemia neonatal. Outras infecções não comuns já foram descritas, como endocardites, miocardites, pneumonias, pleurites, hepatites, peritonites e abscessos localizados, dentre outros (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001, 2017; JAY, 2005).

Em casos com o sistema nervoso central (SNC) comprometido, a listeriose é manifestada mediante o surgimento de meningite ou meningoencefalite. A meningite ocorre principalmente em recém-nascidos e idosos e o seu desenvolvimento clínico é fulminante, pois apresenta um índice de mortalidade de aproximadamente 70%. É estimado que a infecção originada por *L. monocytogenes* é responsável por 10 % de todas as meningites causadas por micro-organismos (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Muitos indivíduos saudáveis (2-6%) são portadores fecais assintomáticos de *L. monocytogenes*. O risco de doença clínica nos portadores intestinais de *L.*

monocytogenes é desconhecido, mas deve ser muito baixo devido à raridade do diagnóstico da doença (BORGES et al., 2009).

O período de incubação da listeriose varia de horas a semanas. A dose infecciosa aproximada varia de 10^3 a 10^9 UFC/g ou mL, mas há relatos de surtos com contaminação muito baixa. A dose infecciosa, também, varia em função da virulência da cepa e da susceptibilidade do indivíduo (BORGES et al., 2009).

3.5 Fatores de virulência e patogênese de *L. monocytogenes*

A patogênese de *L. monocytogenes* é uma das mais estudadas dentre os patógenos de origem alimentar, a bactéria possui uma excelente capacidade infectante, porque é capaz de atravessar barreiras protetoras gastrointestinais, materno-fetais e sangue-cerebrais. O patógeno penetra no organismo humano por ingestão, aderindo à mucosa intestinal, e por estratégia de invasão e multiplicação intracelular (TRABULSI et al., 2008), sobrevivendo e proliferando em macrófagos, enterócitos e outras células (JAY, 2005).

O processo invasivo de *L. monocytogenes* acontece em 5 estágios bem definidos: a internalização do patógeno pela célula hospedeira, o escape do vacúolo, a multiplicação da bactéria no citoplasma da célula hospedeira, a movimentação da bactéria no citoplasma devido à polimerização de filamentos de actina da célula hospedeira em um dos polos da bactéria que a propulciona para a célula adjacente, onde iniciará um novo ciclo de infecção após a destruição do vacúolo de dupla membrana que a circunda (JAY, 2005).

Linhagens virulentas de *L. monocytogenes* podem romper a barreira de muco e penetrar nas células do tecido epitelial. Sintomas gastrointestinais são observados em apenas um terço dos casos humanos (JAY, 2005).

As bactérias circulantes (90%) são rapidamente eliminadas da corrente sanguínea, no fígado e na vesícula, por macrófagos residentes, entretanto as sobreviventes se multiplicam nos hepatócitos. Se o sistema imunológico do hospedeiro estiver ativo, 5 a 7 dias pós-infecção, já não se encontra *L. monocytogenes* nos órgãos (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Se a infecção não for controlada por uma resposta imunológica no fígado, a proliferação de *L. monocytogenes* pode levar à sua liberação na corrente sanguínea, atingindo o cérebro e placenta, dessa forma ocorrerão infecções sistêmicas que podem levar à morte. Sabe-se, assim também que este patógeno tem tropismo para o sistema nervoso central e úteros grávidos. Portanto a resposta imune do hospedeiro é inibida pela capacidade de replicação e disseminação de *L. monocytogenes* entre célula-célula (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; ALEJANDRA et al., 2013). Na Figura 3 está representado o ciclo de infecção intracelular de *L. monocytogenes*.

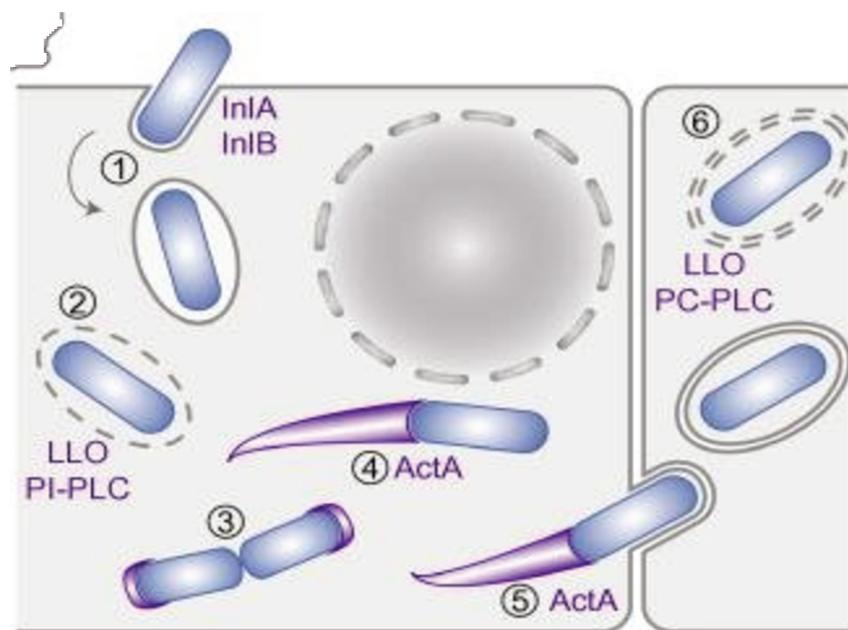


Figura 3. Ciclo de infecção intracelular de *Listeria monocytogenes*. (1) Entrada de *L. monocytogenes* nas células hospedeiras por ação das internalinas InlA e InlB. (2) Vacúolo endocítico é rompido através da ação de LLO e PI-PLC. (3) Bactérias se replicam no citosol. ActA estimula a polimerização da actina, dando origem a caudas de actina, importantes para a motilidade intracelular. (4 e 5) Disseminação célula-célula da bactéria. (6) Ruptura do vacúolo mediado por ação da LLO e PC-PLC.

Fonte: COSSART; LEBRETON, 2014.

Existem vários fatores de virulência responsáveis pela patogênese da *L. monocytogenes* e, em cada etapa, existem várias proteínas de virulência envolvidas. Muitos fatores de adesão já foram identificados e estão envolvidos na adesão da bactéria com a célula hospedeira, como a internalina A (InlA), internalina B (InlB), proteína de invasão associada à virulência (Vip), proteína de adesão de *Listeria* (LAP), proteína de ligação de fibronectina (Fbp), autolisina amidase (Ami), hidrolase

de parede celular (p60), lipoproteína para promover a entrada (LpeA) e ácido lipoteicóico (LTA). O tamanho, o receptor e a função das principais proteínas de virulência são indicados na Tabela 2 (BHUNIA, 2008; KUHN et al., 2008).

Tabela 2. Principais proteínas de virulência em *L. monocytogenes*.

Fatores de virulência	Tamanho (kDa)	Receptor	Função
Proteína reguladora (PrfA)	27	-	Regulação da expressão de proteínas de virulência.
Internalina A (InIA)	88	Proteína de junção aderente	Responsável pela invasão em células epiteliais do intestino e placenta.
Internalina B (InIB)	65	Met (tirosina quinase), gC1q-R/p32	Entrada em hepatócitos, na fase hepática da infecção.
Proteína de virulência (Vip)	43	Gp96 (proteína chaperona)	Invasão das células epiteliais.
Proteína de adesão de <i>Listeria</i> (LAP)	104	Hsp60 (proteína chaperona)	Adesão a células epiteliais intestinais.
Autolisina amidase (Ami)	102	Peptideoglicano	Adesão às células hospedeiras.
P60 (hidrolase da parede da célula)	60	Peptideoglicano	Adesão / invasão.
Listeriolisina (LLO)	58-60	Colesterol	Auxilia a fuga do fagossoma no interior da célula.
Proteína de polimerização da actina (ActA)	90	-	Nucleação de cauda de actina para o movimento no interior do citoplasma celular.
Fosfolipase (PI-PLC; - PC-PLC) *	29–33	-	Lise da membrana do vacúolo.
Metaloprotease (Mpl)	29	-	Ajuda na síntese do PLC.

*PI-PLC: fosfolipase C fosfatidilinositol; PC-PLC: fosfolipase C fosfatidilcolina

Fonte: BHUNIA, 2008.

A internalização de *L. monocytogenes* inicia-se com a adesão do micro-organismo à superfície da célula eucariótica (COSSART, TOLEDO-ARANA, 2008) que envolve a interação da InIA e InIB. Estas internalinas são proteínas responsáveis por induzir a ligação com a célula do hospedeiro para a internalização do patógeno e são codificadas pelos genes *inIA* e *inIB*, que são particularmente importantes para a patogenicidade de *L. monocytogenes*. (PIZARRO-CERDA, COSSART, 2006; CABANES, 2004).

No processo de internalização é requerida a interação da InIA, proteína com 800 aminoácidos que promove a entrada de *L. monocytogenes* nas células hospedeiras, com a E-caderina, receptor presente na superfície das células epiteliais do intestino (KUSSEL- ANDERMANN et al., 2000). A Internalina B, por outro lado, é composta por 630 aminoácidos e reconhece os receptores de diferentes tipos de células, levando à internalização em hepatócitos, fibroblastos e células não epiteliais (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Após a adesão e entrada na célula hospedeira, a bactéria fica confinada dentro de um vacúolo (fagossomo). As proteínas de virulência LLO e PI-PLC destroem o fagossomo e permitem o escape da bactéria para multiplicação no citoplasma da célula (BHUNIA, 2008).

As linhagens virulentas produzem uma substância exocelular, formadora de poros e ativada por grupamentos tiol, a qual é conhecida por listeriolisina O (LLO) (JAY, 2005). A LLO é codificada pelo gene *hly* e foi o primeiro fator de virulência descoberto. É uma hemolisina que está envolvida na invasão do epitélio intestinal, no escape da célula hospedeira (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001) e também contribui para a difusão do micro-organismo célula a célula (JAY, 2005). LLO é essencial para a virulência de *L. monocytogenes* e só é encontrado em cepas virulentas. A detecção de LLO em uma amostra de alimento também pode ser um indicador da presença de *L. monocytogenes* (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

LLO necessita de duas fosfolipases C (igualmente secretadas por *L. monocytogenes*) para efetuar a lise dos vacúolos intracelulares primário e secundário. Sendo estas a fosfolipase C fosfatidilinositol (PI-PLC), codificado pelo gene *plcA* que atua sinergicamente com LLO para destruir a bicamada lipídica do

fagossoma e a fosfolipase C fosfatidilcolina (PC-PLC), codificado pelo gene *plcB*. Para ocorrer a ativação da PC-PLC é necessário outro fator de virulência, a metaloprotease (Mpl) que é codificada pelo gene *mpl* (BHUNIA, 2008; KUHN et al., 2008).

Os fatores de virulência codificados por *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* e *plcB* são responsáveis pelo parasitismo intracelular de *L. monocytogenes*. Estes genes estão em uma ilha cromossomal de 9 kb, conhecida como ilha 1 de patogenicidade de *Listeria* (LIPI-1). Aqueles genes presentes na LIPI-1, incluindo três locus cromossômicos adicionais, o operon *inlAB* e os genes *inlC* e *hpt* estão regulados por uma proteína reguladora (PrfA) de 27 kD. A PrfA está envolvida diretamente com a expressão dos genes, porém, pode ser um ativador ou repressor dos genes e o gene *prfA* que codifica a proteína, está conservado em todas as cepas de *L. monocytogenes*. Os genes *inlC* e *hpt* codificam a internalina C (InlC) e a proteína transportadora de hexose 6-fosfato, respectivamente. O *inlC* é importante para a virulência na disseminação pós-intestinal e proteína transportadora de hexose 6-fosfato é importante para o crescimento intracelular de *Listeria*. (DE LAS HERAS et al., 2011; VELGE; ROCHE, 2010; VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Após o escape da bactéria do fagossomo, esta se multiplica primeiro antes de infectar uma nova célula. Embora vários fatores proteicos estejam envolvidos durante esta etapa, estes não são considerados como as principais proteínas de virulência. Três proteínas auxiliam nesta propagação, a proteína de polimerização da actina (ActA), PC-PLC e metaloproteases de zinco (Mpl). (BHUNIA, 2008).

ActA é uma proteína com 639 aminoácidos que induz a polimerização dos filamentos de actina promovendo o movimento da bactéria no citoplasma da célula hospedeira e a difusão célula-a-célula (KUHN et al., 2008). Uma mutação no gene *actA* leva à incapacidade de polimerizar a actina e, portanto, a incapacidade de infectar células adjacentes. Uma mutação no *plcB* ou *mpl* também induzirá uma virulência reduzida (BHUNIA, 2008).

Diversos genes de virulência de *L. monocytogenes* são reprimidos à temperaturas inferiores a 25°C, por exemplo, num alimento mantido sob refrigeração, porém esta repressão não afeta sua expressão após a infecção.

Algumas cepas recuperam esta habilidade mais rapidamente do que outras, o que talvez seja relevante para o processo infeccioso (MAPA, 2002).

3.6 Sorotipos de *L. monocytogenes*

Os isolados de *L. monocytogenes* são frequentemente caracterizados abaixo do nível de espécie para fins de vigilância em saúde pública e para auxiliar na investigação de surtos. Existem 13 sorotipos de *L. monocytogenes* que podem causar doença, no entanto, mais de 90 % dos isolados humanos pertencem a três sorotipos: 1/2a, 1/2b e 4b. *L. monocytogenes* sorotipo 4b são responsáveis por 33 a 50% dos casos humanos esporádicos em todo o mundo e as cepas do grupo antigênico 1/2 (1/2a, 1/2b e 1/2c) predominam em isolados de alimentos (DOYLE; BEUCHAT, 2007; ORSI et al., 2011; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007), sendo indicado o sorotipo 4b como o melhor adaptado nos tecidos celulares de hospedeiros mamíferos (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Para determinar os sorotipos de *L. monocytogenes*, atualmente é utilizada a técnica de multiplex PCR a qual possui maior poder discriminatório (DOUMITH et al., 2004). Essa técnica é mais confiável e rápida em comparação ao alto custo, disponibilidade de mercado e menor poder discriminatório da técnica de aglutinação.

Na pesquisa desenvolvida por Doumith et al. (2004), pelo menos 95 % das amostras isoladas de alimentos contaminados e pacientes infectados eram dos sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b, o método classificou esses sorotipos e os diferenciou dos sorotipos menos frequentes: 3a, 3b, 3c, 4d, 4e e 7. Além disso, relataram que a maioria dos casos esporádicos de epidemias era causada pelo sorotipo 4b, sugerindo que tais estirpes podem possuir propriedades únicas de virulência.

Vitullo et al. (2013) realizaram um estudo para diferenciar sorogrupos de *L. monocytogenes* de outras espécies de *Listeria* usando ensaios tríplex de PCR em tempo real. Os isolados provenientes de casos humanos, alimentos e ambientes foram classificados em 4 grupos com 13 sorotipos identificados. O sorogrupo I agrupa os sorotipos 1/2a e 3a, sorogrupo II agrupa os sorotipos 1/2c e 3c, sorogrupo

III possui os sorotipos 1/2b, 3b e o sorogrupo IV compreende os sorotipos 4b, 4d, 4e e 4b atípico.

No Brasil, o Instituto Oswaldo Cruz (IOC) analisou 255 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de diferentes materiais clínicos humanos, no período entre 1969 a 2000 de várias regiões do país, e verificou-se que o sorotipo mais incidente foi 4b seguido por 1/2a (HOFER et al., 2006).

3.7 Subtipagem de *L. monocytogenes*

Os métodos de subtipagem tornam-se relevantes na avaliação da epidemiologia, ecologia e população genética de *L. monocytogenes*, incluindo a diferenciação dos potenciais de virulência, dado que apenas certos subtipos são de grande ameaça à saúde humana (WIEDMANN, 2002; KABUKI et al., 2004).

Para a subtipagem de *L. monocytogenes* existem duas abordagens que são comumente usadas, a subtipagem fenotípica e a genotípica. A subtipificação por métodos fenotípicos inclui fagotipagem, sorotipagem e MEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*). Os métodos de subtipagem genotípicos incluem técnicas baseadas no sequenciamento de DNA, por exemplo, MLST (*Multilocus Sequence Typing*) e MLVA (*Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis*) (SALEH-LAKHA et al., 2013), além do PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) (GRAVES; SWAMINATHAN, 2001), REA (*Restriction Endonuclease Analysis*) (COCOLIN et al., 2005), ribotipagem (WIEDMANN, 2002), RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) (GRAVESEN et al., 2000); RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (ROUSSEAU et al., 2004), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (GUERRA et al., 2002) e PCR em tempo real (*Real-Time PCR*) (RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2004).

Esses métodos tornaram-se ferramentas inestimáveis para investigações epidemiológicas, devido à capacidade de tipificar todas as cepas, alto poder discriminatório e reprodutibilidade característica de cada método. Nos Estados Unidos, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estabeleceu uma rede (PulseNet) de laboratórios reguladores de saúde e alimentação para a subtipagem

de bactérias patogênicas de origem alimentar para detectar rapidamente grupos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) que podem ter uma origem comum (DOYLE; BEUCHAT, 2007).

Os ensaios de subtipagem de *L. monocytogenes* auxiliam no entendimento da importância biológica e reguladora das linhagens evolutivas que foram identificadas dentro desta espécie. Outras das vantagens são a caracterização molecular, rastreamento e controle do patógeno, principalmente naquelas linhagens, sorotipos ou clones epidêmicos que são responsáveis por surtos alimentares (RAWOOL et al., 2016).

A subtipagem tem sido utilizada também para correlacionar as variações dentro das linhagens, dessa maneira Wiedmann et al. (1997) classificaram os isolados de *L. monocytogenes* em três linhagens distintas com base na combinação dos seus padrões de ribotipos e PCR-RFLP de dois genes de virulência (*hlyA* e *actA*). A linhagem I composta por isolados clínicos humanos associados à doença esporádica e surto; linhagem II contém isolados humanos e animais, mas nenhum de surtos epidêmicos; e linhagem III com isolados apenas de animais. Isolados da linhagem I eram dos sorotipos 1/2b e 4b, enquanto isolados da Linhagem II dos sorotipos 1/2a e 1/2c. Assim, também com a técnica de PCR-RFLP, Rousseaux et al. (2004) identificaram o polimorfismo do gene *inlA* de estirpes potencialmente não invasivas de *L. monocytogenes*, conseguindo identificar dez novas estirpes com mutações pontuais que conduziram à produção de InlA truncado.

Em outro estudo, Orsi et al. (2011) utilizando uma variedade de técnicas genotípicas e fenotípicas, compreendendo ribotipagem, eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e tipagem de sequências de multilocus (MLST), agruparam os isolados de *L. monocytogenes* e distinguiram quatro tipos de linhagens (I-IV), evidenciando também a relação da linhagem I com doenças em humanos e a adaptação da linhagem II para sobreviver em ambientes alimentícios, sendo ambas as linhagens importantes na infecção humana. A linhagem III foi ocasionalmente isolada de casos clínicos humanos e não foi reconhecida como patogênica e por último a linhagem IV não foi associada com casos clínicos humanos. Esses 4 grupos de linhagens se diferenciam no potencial de virulência, compreendendo a linhagem I os sorotipos 1/2b, 3b, 4b e 3c; linhagem II com sorotipos 1/2a, 1/2c, 3a, linhagens III

e IV não são comuns e estão representados normalmente pelos sorotipos 4a, 4b, 4c (ORSI et al., 2011). Adicionalmente a linhagem III foi separada em três subgrupos: IIIA, IIIB e IIIC (LIU et al., 2006; ROBERTS et al., 2006).

3.8 Surtos e casos de listeriose associados às frutas

As frutas raramente eram implicadas com listeriose, no entanto nos últimos anos alguns surtos foram relatados envolvendo o seu consumo. Os surtos deste patógeno são dificilmente identificados, pois pode sobreviver no corpo muito antes de se estabelecer sintomas, facilitando a contaminação de pessoa para pessoa (CDC, 2014).

O primeiro surto em frutas de grande importância ocorreu em 2011 e foi o relatado pelo “*Centers for Disease Control and Prevention*” - CDC (2011) relacionado com melões contaminados nos Estados Unidos. O surto envolveu 33 óbitos, um aborto e 147 casos; os melões provinham de uma granja de Granada, Colorado. O *Food and Drug Administration* (FDA, 2011) identificou os fatores que provavelmente contribuíram para a introdução, disseminação e crescimento de *L. monocytogenes* nos melões. A introdução do patógeno pode ter decorrido a partir de uma goteira que contaminou a linha de condensação, dessa forma a água ficava acumulada em buracos do chão e em espaços irregulares que eram difíceis de limpar. As análises microbiológicas da água foram positivas para *Listeria* que adoeceu as pessoas. A FDA também afirmou que várias áreas do equipamento de lavagem e secagem das frutas pareciam não estar limpas, com sujeira e acúmulo de produtos visíveis em algumas regiões do equipamento, mesmo depois de terem sido desmontados e higienizados. Além disso, os inspetores descobriram que uma máquina de lavar, projetada para a limpeza de batatas, tinha sido substituída para limpar os melões (FDA, 2011).

De acordo com o CDC (2014), em 2014 na Califórnia, Estados Unidos, aconteceu o primeiro surto de *L. monocytogenes* associado ao consumo de frutas com caroço incluindo pêssegos inteiros, nectarinas e ameixas. Foram quatro casos reportados e identificados por Chen et al. (2016) mediante PFGE e sequenciamento do genoma completo. Todos os casos humanos pertenceram ao sorotipo 4b, e dos

17 isolados ambientais, 3 eram do sorotipo 4b e 14 do sorotipo 1/2b, todos os isolados das amostras ambientais, pacientes e frutas tinham padrões de PFGE indistinguíveis dos isolados das frutas de caroço da empresa produtora. Os resultados da análise de sequenciamento do genoma completo junto com os dados de consumo sugeriram que estas frutas também eram prováveis fontes de infecção de *L. monocytogenes*.

Outro surto ocorrido entre outubro de 2014 e janeiro de 2015 foi reportado nos Estados Unidos pelo CDC (2015). Um total de 35 pessoas foi infectado com *L. monocytogenes* após consumirem maçãs do amor embaladas comercialmente nos Estados Unidos. O patógeno foi responsável por pelo menos 3 das 7 mortes e uma gestante teve como consequência perda fetal.

Mais recentemente o CDC (2016) relatou 9 casos de pessoas infectadas com *L. monocytogenes*, com uma morte em 4 estados diferentes dos Estados Unidos entre setembro de 2013 e maio de 2016. Os vegetais e frutas congeladas contaminados foram a causa do surto e tais produtos foram vendidos sob nomes de diferentes marcas, mas previamente eram produzidas na empresa de alimentos *CRF Frozen Foods* situada em Washington, Estados Unidos. Dentre os produtos de frutas congeladas estavam envolvidos mirtilos, cerejas, airelas (*cranberries*), pêssegos, framboesas e morangos.

3.9 *Listeria* em frutas

O potencial de contaminação por *Listeria* sp. em frutas pode ser alto, devido à variedade de condições de contaminação para o qual o produto é exposto durante o seu crescimento, colheita e distribuição (MADDEN, 1992).

3.9.1 Prevalência em frutas e produtos de frutas

A ocorrência de *Listeria* sp. em frutas não é muito avaliada, porém devido a capacidade de se desenvolver e sobreviver em ambientes com baixas temperaturas, podem estar presentes em ambientes industriais, principalmente se o ambiente estiver molhado ou úmido, e também em equipamentos formando biofilmes. A

habilidade de sobreviver em pH baixo facilita a sua ocorrência em frutas e sucos ácidos (KIM; CHO, 2010; DOYLE; BEUCHAT, 2007).

A baixa prevalência de *Listeria* sp. em frutas deve-se ao fato da maioria das frutas crescer em árvores ou acima do solo, portanto o contato das frutas com o solo, água ou fezes contaminadas com *L. monocytogenes* é menos frequente (BRACKETT, 2007).

De acordo com a legislação brasileira, não há padrões de tolerância para a presença de *L. monocytogenes* em vegetais ou frutas (BRASIL, 2001).

Sado et al. (1998) avaliaram a ocorrência de *L. monocytogenes*, *E. coli* 0157:H7, *Salmonella*, coliformes totais e coliformes termotolerantes em amostras de sucos não pasteurizados do varejo em Washington, Estados Unidos. Os isolados foram positivos pelo kit de teste rápido API Listeria® e por PCR multiplex para detecção dos genes *hlyA* e *iap*. Os resultados, em 50 amostras analisadas, mostraram a presença do patógeno em uma amostra de suco de maçã (pH 3,78) e uma amostra de suco de framboesa (pH 3,75).

Outro estudo revelou a presença do patógeno em produtos frescos obtidos de mercados da cidade de Oslo, Noruega. Foram 890 amostras que incluíram alface, saladas pré-cortadas, salsa, champignons e morangos, coletadas entre 1999 e 2001. Johannessen et al. (2002) identificaram a presença de *L. monocytogenes* pertencente ao sorogrupo 4 em uma amostra de alface e uma de morango, enquanto o sorogrupo 1 foi isolado de uma amostra de champignon.

A presença de *L. monocytogenes* foi confirmada em polpas de graviola, manga e maracujá adquiridas dos principais mercados de San José, Costa Rica, embora as contagens fossem relativamente baixas pela adição de conservantes. Das 60 amostras, 3 foram positivas e provinham de uma mesma indústria (VON BREYMANN et al., 2013).

Na pesquisa realizada por Souza (2014) foi avaliada a prevalência de *Listeria* spp. em melão (150 amostras) e jabuticaba (60 amostras), adquiridas no comércio varejista do Município de Viçosa – MG, Brasil. Confirmou-se a presença deste micro-organismo em 9,33% (14/150) das amostras de melão e nenhum isolado da

jabuticaba, mediante sequenciamento genético. A reação de PCR revelou a presença de apenas uma estirpe (0,47% do total de amostras) de *L. monocytogenes* identificada com o sorotipo 1/2b.

3.9.2 Crescimento e sobrevivência em frutas

L. monocytogenes conseguiu sobreviver em maçãs fatiadas (pH 4,7) mantidas a 5 °C por 12 dias e a população bacteriana cresceu 1 log/UFC a 10 °C e 20 °C por 7 dias (0,5 % e 15 % de CO₂) segundo o estudo realizado por Conway et al. (2000) em Beltsville, MD, Estados Unidos.

Em outro estudo realizado por Behrsing et al. (2003), foi avaliada a capacidade de sobrevivência de *L. innocua* na superfície de frutas com cascas não comestíveis. *L. innocua* sobreviveu melhor do que *Salmonella* Salford e *E. coli* durante a estocagem das frutas (banana, maracujá, melão cantaloupe e *honeydew*), devido à capacidade psicotrófica que apresenta, resistindo a temperatura de refrigeração. A população do patógeno na casca do melão aumentou ao redor de 2 log UFC/mL após 7 dias a 8 °C. Em refrigeração abaixo de 4 °C, *L. innocua* conseguiu sobreviver, mas não se multiplicar.

Penteado e Leitão (2004) estudaram a capacidade de desenvolvimento deste micro-organismo em frutas de baixa acidez, como mamão (pH 4,87±0,01), melancia (pH 5,50±0,06) e melão (pH 5,87±0,13), em temperaturas de 10, 20 e 30 °C. Foi evidenciado experimentalmente que após 7 dias de estocagem a 10 °C as contagens de *L. monocytogenes* aumentaram de 10² para 10⁹ UFC/g na polpa do melão, e nas polpas de melancia e mamão foi de 10⁶ UFC/g e 10⁵ UFC/g, respectivamente. Os resultados confirmam que baixas temperaturas podem retardar, mas não inibir o crescimento da bactéria.

Num estudo feito por Flessa et al. (2005), foi avaliada a capacidade de *L. monocytogenes* em sobreviver em temperaturas de 24 °C, 4 °C e -20 °C na superfície de morangos inteiros e fatiados (pH 3,6-3,8) por período de quatro semanas. A população de *L. monocytogenes* inoculada em morangos fatiados não teve quedas significantes em 48 h a 24 °C, com redução de 1,0 log UFC por amostra

e 3 log UFC por amostra em morangos após 7 dias em refrigeração a 4 °C. Após 28 dias em armazenamento a -20 °C o máximo de declínio foi de 1,2 log UFC por amostra. Na pesquisa foi constatado que o patógeno é capaz de sobreviver, mas não de crescer na superfície de morangos frescos, intactos ou fatiados e que em morangos congelados *L. monocytogenes* sobreviveu por períodos de quatro semanas.

Da mesma forma, Uchima et al. (2008) estudaram o crescimento de *L. monocytogenes* em duas variedades de caqui, 'Fuyu' e 'Rama Forte' com pH 6,3 e 5,5, respectivamente. As frutas foram submetidas à diferentes temperaturas (10, 20 e 30 °C). Em ambas as variedades se observou o crescimento da população, sendo que na 'Rama Forte' houve aumento de 1,7; 2,0 e 3,0 log/UFC e na variedade 'Fuyu' 2,7; 2,4 e 2,8 log/UFC após 5 dias de estocagem a 10 °C. Os resultados revelaram que o patógeno sobrevive tanto na polpa quanto na casca, e as baixas temperaturas retardaram, mas não evitaram o seu crescimento.

A capacidade de crescimento de *L. monocytogenes* ácido adaptadas foi demonstrada em suco de laranja minimamente processadas. As células, após serem adaptadas em TSB com pH 5,7 por 3 h, foram inoculadas em suco de laranja diluído com pH 2,6 e mantidos a 4 °C e 25 °C. Após 6 dias de estocagem a 4 °C registou-se um aumento de 1,95 log e a 25 °C um aumento de 2,42 log. Neste estudo, Caggia et al. (2009) confirmaram a capacidade de adaptação do patógeno em condições adversas.

Salazar et al. (2016) estudaram os fatores que influenciaram a sobrevivência e crescimento em maçãs do amor devido ao surto acontecido entre 2014 e 2015. As amostras foram adquiridas de supermercados locais de varejo em Illinois, Estados Unidos e inoculadas posteriormente com o patógeno. A pesquisa mostrou que o patógeno sobreviveu, mas não cresceu. As reduções da população foram de 1 a 4 log quando armazenadas a 25 °C por até 49 dias. Os resultados foram semelhantes ao de Glass et al. (2015) cujos estudos concluíram que a inserção do palito na maçã desenvolvia um microambiente adequado para o crescimento de *L. monocytogenes* pelas quantidades de nutrientes presentes e a elevada atividade de água da exsudação da fruta.

3.9.3 Sanitização em frutas

A eficiência dos sanitizantes como redutor da carga microbiana de *Listeria monocytogenes* e a capacidade de crescimento do patógeno em melões a baixa temperatura, foi avaliada por Ukuku e Fett (2002). No estudo, melões inoculados com o patógeno foram tratados com hipoclorito de sódio (1.000 ppm) e peróxido de hidrogênio (5%) por 0, 1, 3, 6, 9 e 15 dias a 4 °C. Os pesquisadores concluíram que os sanitizantes utilizados reduziram levemente a população nas primeiras 24 h, detectando <2 UFC/cm² após o tratamento. No entanto, a bactéria sobreviveu por até 15 dias de estocagem a 4°C.

Outro estudo avaliou a sobrevivência de *L. monocytogenes* em mirtilos frescos (pH 3,7) adquiridos de um distribuidor local em Blacksburg – VA, Estados Unidos. As amostras foram mantidas em diferentes condições durante 10 dias: a 4 °C com 4 ppm de gás ozônio e 12 °C com 2,5 ppm de gás ozônio. Os tratamentos de ozônio reduziram 3 e 2 logs, respectivamente. A pesquisa concluiu que o patógeno sobreviveu em atmosferas com baixo oxigênio, sob estresse ácido e sob condições de refrigeração (CONCHA-MEYER et al., 2014).

3.10 Susceptibilidade de *L. monocytogenes* aos antimicrobianos

Atualmente, os antimicrobianos vêm sendo utilizados indiscriminadamente, portanto é importante o estudo da susceptibilidade de diversos antibióticos frente a micro-organismos patogênicos por tornarem-se cada vez mais resistentes.

As primeiras cepas multirresistentes de *L. monocytogenes* foram isoladas na França em 1988 (POYART-SALMERON et al., 1990). O patógeno se desenvolve no ambiente extracelular, dessa maneira fica exposto aos agentes antimicrobianos, mas dentro da célula não são todos efetivos contra o micro-organismo. Hospedeiros comprometidos e pessoas imunodeprimidas são mais difíceis de tratar do que aquelas saudáveis (JAY, 2005), tornando-se difícil nesse grupo de indivíduos o tratamento contra a doença, e considerando que apenas alguns agentes antimicrobianos têm atividade bactericida frente a *L. monocytogenes* (HOF et al., 1997).

Geralmente a terapia utilizada para o tratamento de *Listeria* inclui a administração de ampicilina ou penicilina G, em combinação com um aminoglicósido (CONTER et al., 2009). No Brasil, os antibióticos utilizados como primeira escolha para o tratamento de meningites por *L. monocytogenes* também são ampicilina em combinação com um aminoglicosídeo, podendo ser gentamicina ou amicacina, ou o uso de ampicilina com penicilina G cristalina. Os antibióticos de segunda escolha utilizados geralmente são cefalosporinas em combinação com ampicilina e também é usado cloranfenicol (BRASIL, 2009).

Para garantir a eficiência do tratamento de listeriose é necessário avaliar a susceptibilidade do patógeno mediante uma vigilância contínua, dessa forma são analisadas as cepas isoladas de alimentos e ambientes de produção para determinar a resistência aos antibióticos mais usados (CONTER et al., 2009).

Um estudo realizado na França avaliou os mecanismos de resistência aos antibióticos em estirpes de isolados clínicos, ambientais e alimentares de *L. monocytogenes*, comprovando que as bactérias podem transferir genes de resistência aos isolados nos alimentos, ambiente ou no trato intestinal (MORVAN et al., 2010). Assim, também foi demonstrado que o micro-organismo obtém os genes de resistência através de uma transferência horizontal de genes, entre micro-organismos gram-positivos e negativos, mediada por elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons (CHARPENTIER; COURVALIN, 1999; LUNGU et al., 2011).

Embora *L. monocytogenes* seja susceptível a diferentes antibióticos, alguns isolados de alimentos envolvidos em surtos apresentaram perfil de multirresistência em diferentes estudos (MARIAN et al., 2012; REIS et al., 2011; ALTUNTAS et al., 2012) devido ao problema do uso indiscriminado de antimicrobianos.

Diversos estudos têm demonstrado a resistência deste patógeno à tetraciclina, sendo este antibiótico indicado comumente no tratamento da listeriose em pacientes que apresentam alergia a outros antibióticos (POYART-SALMERON et al., 1992; SRINIVASAN et al., 2005; BERTRAND et al., 2005; SAKARIDIS et al., 2011).

Sakaridis et al. (2011) relataram a resistência de *L. monocytogenes* à clindamicina (84 %) e tetraciclina (13 %) em isolados de carcaças de frango, no entanto foi susceptível aos seguintes antimicrobianos: ciprofloxacina, eritromicina, vancomicina, penicilina, ampicilina, cefalotina, cloranfenicol e gentamicina.

Uma pesquisa realizada por Altuntas et al. (2012) revelou a susceptibilidade de *L. monocytogenes* isolada de alimentos derivados de animais aos antibióticos tetraciclina, cloranfenicol, rifampicina, eritromicina, gentamicina, vancomicina, trimetoprim e penicilina, além disso foi comprovada a resistência à estreptomicina e fosfomicina.

A resistência do patógeno isolado de amostras de alimentos prontos para o consumo, também foi demonstrada por Kovacevic et al. (2012), que identificaram a resistência de isolados de *Listeria* spp. à cefoxitina e ao ácido nalidíxico e *L. monocytogenes* à clindamicina, estreptomicina e amicacina,

A susceptibilidade de *L. monocytogenes* em produtos de carnes e ambientes de processamento entre maio de 2009 e abril de 2012 também foi avaliada para 20 antibióticos e revelou a resistência a um ou dois antibióticos em 71 isolados (34,5 %) que foram recuperados em uma indústria na Espanha. Identificou-se 1 isolado (0,5 %) resistente à tetraciclina, recuperado de superfícies de aço inoxidável e 8 isolados (3,9 %) com susceptibilidade reduzida, recuperados de produtos de carne. O fenótipo resistente à oxacilina estava presente em 100% dos isolados e também foi observada a multirresistência em seis isolados (2,9 %). De acordo com os autores, nos últimos anos a efetividade da tetraciclina tem diminuído provavelmente pelo uso extensivo de antibióticos (GOMEZ et al., 2014).

Outros estudos indicaram que *L. monocytogenes* é susceptível ao sulfametoxazol, azitromicina, meropenem, clindamicina, cefalosporina e resistente a fosfomicina, ciprofoxacina, amicacina (TROXLER et al., 2000; PESAVENTO et al., 2010; RUIZ-BOLIVAR et al., 2011).

Portanto, os estudos de avaliação da suscetibilidade dos isolados são importantes para determinar o perfil de resistência antimicrobiana. O aumento da resistência antimicrobiana torna-se um grave problema à saúde pública devido à alta taxa de mortalidade nas infecções por *L. monocytogenes*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As análises das amostras foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos I (DCA/FEA/UNICAMP).

4.1 Obtenção das amostras

Foi analisado um total de 160 amostras de produtos derivados de frutas compreendendo 80 amostras de polpas de frutas congeladas e 80 frutas minimamente processadas adquiridas em supermercados da cidade de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil.

4.1.1 Polpa de frutas congeladas analisadas

Foram analisadas polpas de frutas congeladas correspondentes aos sabores: Manga, Graviola, Açaí, Morango, Acerola, Goiaba, Caju, Abacaxi e Coco. Foram selecionadas 7 marcas comerciais diferentes, dentre as quais duas eram não pasteurizadas (A e B) e cinco eram pasteurizadas (C, D, E, F e G).

4.1.2 Frutas minimamente processadas analisadas

Foram avaliadas frutas minimamente processadas adquiridas de 5 supermercados diferentes (A, B, C, D e E) sendo escolhidos os seguintes tipos de amostra: abacaxi descascado e fatiado, melão (Orange, Gália e Amarelo) fatiado ou cortado ao meio, coco ralado, melancia fatiada, mamão cortado ao meio e seleta de frutas composta por kiwi, manga, melão, morango e abacaxi.

4.2 Determinação do pH

O pH foi determinado por potenciômetro em eletrodo de vidro de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) (2005). Dez gramas da amostra foram

diluídas e homogeneizadas em 50 mL de água com posterior medição utilizando um pHmetro de bancada (Starter 2100 Ohaus) devidamente calibrado em solução tampão de pH 4,0 e 7,0.

4.3 Detecção de *Listeria monocytogenes*

4.3.1 Preparo da amostra e isolamento

As amostras foram analisadas segundo a metodologia proposta pelo HPFB “Health Protection Branch” do Canadá (PAGOTTO et al., 2011). Alíquotas de 25 g de cada amostra foram homogeneizadas separadamente em 225 mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* modificado [*UVM modified Listeria Enrichment Broth* (UVMm, Difco)] e homogeneizadas em um Stomacher (Stomacher Lab. Blender 400). Após 24 e 48 h da incubação do LEB a 30 °C, 0,1 mL foi inoculado em 10 mL de caldo modificado Fraser [*MFB modified Fraser Broth* (Difco)]. O MFB foi incubado por 24-48h a 35 °C. Em seguida, o MFB foi semeado por esgotamento em placas contendo ágar Oxford (Difco), adicionado de suplemento antimicrobiano Oxford modificado (BD Bacto™) e ágar Palcam (Difco), adicionado com suplemento seletivo para *Listeria* (Merck). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h. As colônias típicas de *Listeria* em Ágar Oxford apresentam coloração enegrecida e no ágar Palcam coloração cinza esverdeada, em ambos meios apresentam-se côncavas com halo preto formado devido à hidrólise da esculina. As colônias típicas foram examinadas e de 3 a 5 colônias de cada placa foram submetidas à identificação.

4.3.2 Seleção e identificação dos isolados

As colônias típicas isoladas das placas de ágar Oxford e ágar Palcam foram inoculadas por esgotamento em placas contendo ágar tripticase de soja (Difco) com extrato de levedura 0,6 % (Inlab) (TSA-YE). Incubaram-se as placas a 30 °C durante 24-48 h. Após incubação, as colônias foram observadas sob transmissão de luz oblíqua em um ângulo de 45° (método de Henry), e colônias que apresentaram características de *Listeria*, com coloração azulada foram selecionadas, isoladas em

tubos contendo ágar TSA-YE e incubadas a 30 °C por 24 h para sua manutenção e utilização em análises posteriores. Uma cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foi utilizada como controle positivo e usada em cada uma das etapas das análises.

Todos os isolados foram identificados através da bacterioscopia utilizando o método de coloração de Gram. Prepararam-se esfregaços em lamina para verificação das características morfo tintoriais. As espécies do gênero *Listeria* são bastonetes curtos isolados ou em cadeias, Gram-positivos.

4.3.2.1 Provas Bioquímicas

Para a discriminação de *Listeria* sp., mediante provas bioquímicas, foram realizados o teste de motilidade a 25 °C, teste de fermentação de carboidratos e teste de produção de catalase (PAGOTTO et al., 2011).

- Teste de Fermentação de Carboidratos

Para o teste de fermentação de carboidratos foram utilizadas placas de Petri contendo Ágar Purpura de Bromocresol [Caldo púrpura de bromocresol acrescido com 1,5 % de ágar bacteriológico (HiMedia)] adicionado com os seguintes açúcares: ramnose, xilose e manitol, em concentração de 1 %. Após inoculação em placas foram colocadas em incubação por 24 h a 37 °C. A produção de ácido a partir da utilização desses açúcares foi observada pela formação de um halo amarelo ao redor do inóculo.

- Teste de motilidade

Para a determinação da motilidade, inocularam-se em tubos contendo ágar Sulfeto Indol Motilidade [SIM (Difco)] por picada no centro do meio de cultura e foram incubados por um período de até 7 dias a 25 °C, sendo observados diariamente. *Listeria* sp. apresenta motilidade característica de aspecto de “guarda-chuva”.

- Teste de produção de catalase

Para a verificação da produção de catalase, foram adicionadas gotas de peróxido de hidrogênio 3 % sobre uma porção de cada cultura, dispostas em lâminas de microscopia, a presença da enzima catalase foi identificada pela aparição de bolhas. As cepas de *Listeria* sp, são catalase positivas.

Após, a identificação por testes bioquímicos do gênero *Listeria*, foi realizada a técnica de PCR para confirmação da espécie *L. monocytogenes*.

4.3.2.2 Extração do DNA

Para a extração do DNA, cada isolado mantido em TSA-YE (0,6 % com extrato de levedura), foi cultivado em caldo infusão cérebro e coração [*BHI Brain heart infusion* (Merck)] a 37 °C e incubados por 24 h. Em seguida, 250 µL foram transferidos para tubos eppendorf estéreis e centrifugados a 13.000 x g por 10 min para separação da massa celular e sobrenadante. Após o descarte do sobrenadante, adicionaram-se 95 µL de tampão PCR 1X (10 mM de TrisHCl e 50 mM de KCl) e 4 µL de lisozima [50 mg/mL (Fisher Scientific)], e mantiveram-se à temperatura ambiente por 15 min. Por conseguinte, foi adicionado 1 µL de proteinase K [20 mg/mL (Sigma)] e incubado a 55-60 °C por 60 min e a 95 °C por 8 min (FURRER et al.,1991). Em seguida as amostras foram estocadas a -20 °C até a realização das análises pela técnica de PCR.

4.3.2.3 Identificação de *L. monocytogenes* por PCR

A técnica de PCR para o fragmento de 858 bp do gene de virulência *hlyA* codificador da hemolisina foi utilizada para identificação dos isolados conforme previamente descrito (NORTON et al., 2000). Cada isolado foi testado utilizando os primers $\alpha-1$ e $\beta-1$, as sequências respectivas estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Primers utilizados na identificação de *L. monocytogenes*.

Gene	Sequência (5' – 3')	Produto amplificado (bp)	Referência
<i>hlyA</i>	α -1- F CCT AAG ACG CCA ATC GAA AAG AAA	858	Norton et al., 2002
	β -1 -R TAG TTC TAC ATC ACC TGA GAC AGA		

F: direto; R: inverso

A reação de PCR em um volume total de 50 μ l continha: 1 μ l de DNA molde, 2,0 μ l do primer α -1 12,5 μ M e 2,0 μ l do primer β -1 12,5 μ M, 5 μ l de 10X de tampão PCR/25 mM de MgCl₂ (Sinapse Inc.), 2,5 μ l de dNTP 10 mM (Sinapse Inc.), e 1U de Taq DNA polimerase (Sinapse Inc.). Os ciclos de amplificação da PCR foram realizados no termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient) sendo: etapa inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 s, anelamento a 60 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 minuto e uma etapa final a 72°C por 10 minutos. Como controle positivo dos testes, usou-se o DNA extraído de *L. monocytogenes* ATCC 7644, e, como controle negativo, água Milli-Q esterilizada.

Os produtos amplificados na PCR mediante eletroforese em gel de agarose a 1,5% foram separados e corados com Sybr Safe™ (Invitrogen Life Technologies, EUA) por 30 minutos. A visualização dos produtos foi realizada através de transiluminador UV e fotodocumentados com o sistema Kodak D320. Foram utilizados marcadores de peso molecular de 100 bp (DNA ladder; Sinapse Inc.).

4.4 Determinação dos genes de virulência *inIA*, *inIB*, *plcA*, *plcB*, *prfA* e *actA*

O DNA foi extraído conforme descrito no item 4.3.2.2.

Identificou-se a presença dos genes de virulência *inIA*, *inIB*, *plcA*, *plcB*, *prfA* e *actA* por PCR utilizando as sequências de primers indicadas na Tabela 4.

Tabela 4. Primers utilizados para a determinação dos genes de virulência *inIA*, *inIB*, *plcA*, *plcB*, *prfA* e *actA*.

Gene	Sequência do primer (5' → 3')	Produto amplificado (bp)	Referência
<i>inIA</i>	<i>inIA</i> -F CCT AGC AGG TCT AAC CGC AC	255	Vines e Swaminathan, 1998
	<i>inIA</i> -R TCG CTA ATT TGG TTA TGC CC		
<i>inIB</i>	<i>inIB</i> -F AAA GCA CGA TTT CAT GGG AG	146	Ericsson et al., 2000
	<i>inIB</i> -R ACA TAG CCT TGT TTG GTC GG		
<i>plcA</i>	<i>plcA</i> -F CGA GCA AAA CAG CAA CGA TA	129	Leimeister-Wachter et al., 1991
	<i>plcA</i> -R CCG CGG ACA TCT TTT AAT GT		
<i>plcB</i>	<i>plcB</i> -F GGG AAA TTT GAC ACA GCG TT	261	Vazquez-Boland et al., 1992
	<i>plcB</i> -R ATT TTC GGG TAG TCC GCT TT		
<i>prfA</i>	LIS-F TCA TCG ACG GCA ACC TCG G	217	Germini et al., 2009
	LIS-R TGA GCA ACG TAT CCT CCA GAG T		
<i>actA</i>	actA-946-F TAA AAG TGC AGG GTT AT TG	821 ^a 926 ^b	Wiedmann et al., 1997
	actA-1834-R GGA TTA CTG GTA GGC TCG G		

F: direto; R: inverso; ^a: Tipo alélico de acta 3; ^b: Tipo alélico de acta 4

4.4.1 PCR para genes *inIA*, *inIB*, *plcA*, *plcB*

As amplificações dos genes *inIA*, *inIB*, *plcA* e *plcB* foram conduzidas com modificações segundo Jaradat et al., (2002).

Para a amplificação de cada gene de virulência a PCR foi realizada separadamente em um volume total de 50 µl por cada Mix que continha: 2 µl de DNA molde, 0,4 µl de primer-F 10,0 µM (*inIA*-F, *inIB*-F, *plcA*-F ou *plcB*-F) e 0,4 µl de primer-R 10,0 µM (*inIA*-R, *inIB*-R, *plcA*-R ou *plcB*-R), 5 µl de tampão PCR 10X, 2,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 5 µl de dNTP 2 mM (Sinapse Inc.), 1U de Taq DNA polimerase (Sinapse Inc.) e 34,5 µl de água ultrapura Milli-Q esterilizada. As misturas foram levadas ao termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient) para amplificações os quais foram submetidas aos programas mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Ciclos de amplificação de PCR para a determinação dos genes de virulência *inIA*, *inIB*, *plcA*, *plcB*, *prfA* e *actA*.

Gene	Ciclo inicial	Ciclo (n = 35, 40)			Extensão final
		Desnaturação	Anelamento	Extensão	
<i>inIA</i> ^a	94 °C/3 min	94 °C/1 min	54 °C/2 min	72 °C/1 min	72 °C/10 min
<i>inIB</i> ^a	94 °C/3 min	94 °C/1 min	50 °C/2 min	72 °C/1 min	72 °C/10 min
<i>plcA/plcB</i> ^a	94 °C/3 min	94 °C/1 min	52 °C/1 min	72 °C/1 min	72 °C/10 min
<i>prfA</i> ^b	95 °C/5 min	95 °C/30 s	54 °C/30 s	72 °C/30s	72 °C/5 min
<i>actA</i> ^a	94 °C/2 min	94 °C/1 min	50 °C/1 min	72 °C/1 min	72 °C/5 min

^a 35 ciclos; ^b 40 ciclos

4.4.2 PCR para gene *prfA*

Para o gene *prfA*, as reações da PCR e eletroforese dos produtos foram conduzidas conforme Germini et al. (2009) com modificações. Em um volume total de 50 µL a mistura continha: 2 µL de DNA molde, 1,0 µL de primer LIS-F 10,0 µM e 1 µL de primer LIS-R 10,0 µM, 2,5 µl de tampão PCR 10X, 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,2 µL de dNTP 10 mM (Sinapse Inc.), 1U de Taq Hot Firepol (Hot Start DNA Polymerase, Solis Biodyne) e 16,6 µL de água ultrapura Milli-Q

esterilizada. As misturas foram levadas ao termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient) para as amplificações e submetidas às condições de tempo e temperatura mostrados na Tabela 5.

4.4.3 PCR para gene *actA*

A determinação do gene *actA* foi realizada por PCR, utilizando-se as sequências dos primers: actA-946F e actA-1834R, mostrados na Tabela 4. Esta PCR identifica o polimorfismo alélico de *actA* diferenciando-o em 2 tipos alélicos: o tipo 3 com 821 bp e o tipo 4 com 926 bp, de acordo com Wiedmann et al. (1997).

A reação de PCR em um volume total de 25 µl continha: 1 µL de DNA molde, 1,0 µL do primer α -1 12,5 µM e 1,0 µL do primer β -1 12,5 µM, 2,5 µL de 10X de tampão PCR/25 mM de MgCl₂ (Sinapse Inc.), 0,2 µL de dNTP 10 mM (Sinapse Inc.), e 1U de Taq DNA polimerase (Sinapse Inc.). As misturas foram levadas ao termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient) e a PCR foi realizada conforme detalhada na Tabela 5.

Para todos os genes analisados utilizou-se como controle positivo dos testes, o DNA extraído de *L. monocytogenes* ATCC 7644, e como controle negativo, água Milli-Q esterilizada.

Todos os produtos amplificados foram separados mediante eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com Sybr Safe™ (Invitrogen Life Technologies, EUA) por 30 minutos. A visualização dos produtos foi realizada através de transiluminador UV e fotodocumentados com o sistema Kodak D320. Foram utilizados marcadores de peso molecular de 100 bp (DNA ladder; Sinapse Inc.).

4.5 Susceptibilidade aos antimicrobianos

Analisaram-se os perfis de susceptibilidade das cepas de *Listeria* mediante o método de disco difusão em ágar, utilizando o ágar Mueller Hinton (Merck), de acordo com a metodologia do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* NCCLS (CLSI, 2012).

Os agentes antimicrobianos avaliados quanto à susceptibilidade e as concentrações correspondentes foram: ampicilina 10 µg, ciprofloxacina 5 µg, gentamicina 10 µg, ceftriaxona 30 µg, cefalotina 30 µg, cloranfenicol 30 µg, tetraciclina 30 µg, penicilina G 10 U e sulfazotrim (sulfametoxazol/trimetoprim) 25 µg (Laborclin®).

A turbidez dos inóculos incubados em caldo BHI a 37 °C entre 2 a 6 horas foi ajustada com solução salina (NaCl 0,85%) até a escala 0,5 de McFarland (aproximadamente 1×10^8 UFC/mL). Com auxílio de *swab* estéril, cada inóculo foi semeado nas superfícies de placas contendo ágar Mueller Hinton conforme metodologia da NCCLS (CLSI, 2012). Depois, os discos de antibióticos acima mencionados foram colocados sobre a superfície dos meios inoculados distando das bordas, e as placas foram incubadas por 24 h a 35 °C.

Os diâmetros da zona de inibição de crescimento foram medidos com régua milimétrica, registrados e interpretados de acordo com o perfil de susceptibilidade de *Listeria* estabelecido pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2017) para os antimicrobianos ampicilina e sulfazotrim, contudo, devido à ausência de valores de susceptibilidade de *Listeria* aos antimicrobianos ciprofloxacina, ceftriaxona, gentamicina, cefalotina, cloranfenicol, tetraciclina e penicilina G, foram utilizados valores de zonas de diâmetro de *Staphylococcus* sp. definidas pelo NCCLS (CLSI, 2011) (Tabela 6).

Tabela 6. Medidas dos halos de inibição (mm), segundo o antimicrobiano.

Antimicrobiano	Diâmetro do halo (mm)		
	S	I	R
Ampicilina	≥ 16	-	≤ 16
Sulfazotrim	≥ 29	-	≤ 29
Penicilina G	≥ 29	-	≤ 28
Ceftriaxone	≥ 21	14 - 20	≤ 13
Cefalotina	≥ 18	15 - 17	≤ 14
Cloranfenicol	≥ 18	13 - 17	≤ 12
Tetraciclina	≥ 19	15 - 18	≤ 14
Gentamicina	≥ 19	13 - 14	≤ 12
Ciprofloxacina	≥ 21	16 - 20	≤ 15

S: susceptível, I: resistência intermediária; R: resistente.

Fonte: CLSI M100-S21 (2011); EUCAST (2017).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação do pH em polpas de frutas congeladas e frutas minimamente processadas

A determinação do pH é importante, uma vez que, os valores de pH inferiores a 4,5 impedem a proliferação da maioria dos micro-organismos, sendo utilizado esse parâmetro na indústria alimentar para a preservação dos alimentos. É importante destacar também que o pH varia conforme as condições de armazenagem, ou seja, temperatura, umidade relativa do ar e atmosfera controlada (MONTEIRO et al., 2008, RAIMUNDO et al., 2009).

Listeria sp. cresce otimamente em pH neutro ou ligeiramente alcalino (entre pH 6 a 8), o pH mínimo para o crescimento e sobrevivência do micro-organismo tem sido objeto de um grande número de estudos. Em geral, as espécies crescem numa faixa de pH 4,1 a 9,6. (JAY, 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Em polpas de frutas congeladas o pH das amostras de Manga, Graviola, açaí, morango, acerola, goiaba, abacaxi e caju apresentaram em conformidade com a Instrução Normativa nº 1 de 7 de janeiro de 2000 do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), que dispõe sobre o padrão de Identidade e qualidade de polpas de frutas (BRASIL, 2000). Apenas a polpa congelada de coco não possui limites preconizados na Instrução Normativa vigente.

As amostras que apresentaram menores valores foram nas polpas de acerola e morango (pH 3,47 e 3,48 respectivamente) e a de maior valor o coco (pH 5,52) (Tabela 7).

Das polpas analisadas o coco e o açaí apresentaram pH acima de 4,5, respectivamente, 4,97 e 5,52. É possível determinar que os valores de pH de todas as polpas de frutas congeladas, com exceção do coco e açaí, os classificam como alimentos ácidos, que é uma característica importante, pois contribui para tornar o meio desfavorável para o crescimento de micro-organismos patogênicos. Dessa forma, pode-se dizer que os baixos valores de

pH encontrados nas polpas de frutas congeladas de diferentes variedades, tenham contribuído na inibição de *L. monocytogenes*.

Na tabela 7 são observados os valores médios de pH encontrados para polpas de frutas congeladas, com suas respectivas variações.

Tabela 7. Valores médios de pH de polpas de frutas congeladas.

Produto	Nº de amostras analisadas	Média de pH
Caju	14	3,65±0,3
Goiaba	7	3,90±0,2
Morango	8	3,48±0,3
Acerola	9	3,47±0,4
Manga	18	4,02±0,2
Graviola	7	3,67±0,1
Açaí	7	4,97±0,4
Coco	5	5,52±0,3
Abacaxi	5	3,75±0,2
Total	80	

As frutas minimamente processadas apresentaram valores de pH maiores em comparação de polpas de frutas congeladas e não se encontraram valores de pH preconizados por uma legislação.

Na tabela 8 estão os valores médios de pH das frutas minimamente processadas testadas.

Tabela 8. Valores médios de pH de frutas minimamente processadas.

Produto	Nº de amostras analisadas	Média de pH
Melão Orange	11	5,54±0,2
Melão Amarelo	5	5,60±0,2
Melão Gália	6	5,64±0,2
Melancia	9	5,21±0,4
Mamão	9	5,23±0,3
Abacaxi	17	3,68±0,1
Seleta de frutas*	18	4,19±0,5
Coco	5	5,72±0,3
Total	80	

* seleta de frutas (kiwi, manga, melão, morango, abacaxi, melancia fatiada)

Todas as amostras com exceção da seleta de frutas (pH 4,19) e abacaxi (pH 3,68), apresentaram baixa acidez, o que favorece o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos. Tal característica pode ter influenciado na presença de *Listeria* spp. neste tipo de produto.

5.2 Ocorrência de *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* em produtos de frutas

Foram analisadas um total de 160 amostras (80 de polpas de frutas congeladas e 80 de frutas minimamente processadas), sendo selecionadas 7 marcas comerciais diferentes para polpas de frutas congeladas, dentre as quais duas eram não pasteurizadas (A e B) e cinco eram pasteurizadas (C, D, E, F e G). O número e tipo de amostras analisadas com suas respectivas marcas estão apresentados na Tabela 9.

As técnicas de conservação utilizadas nas indústrias alimentícias para este tipo de produto como refrigeração, congelamento, embalagem e pasteurização, têm como objetivo preservar a qualidade microbiológica e físico-química do produto até o consumo, por consequência, nenhuma cepa típica de *Listeria* spp. foi isolada de polpas de frutas congeladas como mostrado na Tabela 9.

Tabela 9. Número de amostras de polpas de frutas congeladas adquiridas de diferentes marcas comerciais.

Produto	Marca	Amostras	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras positivas para <i>Listeria spp.</i>/ total de amostras
Polpa de fruta congelada não pasteurizada	Marca A	Morango	6	0/36
		Acerola	7	
		Manga	6	
		Caju	4	
		Açaí	6	
		Graviola	2	
		Coco	5	
	Marca B	Manga	2	0/4
		Graviola	1	
		Morango	1	
	Marca C	Caju	2	0/7
		Manga	1	
		Goiaba	2	
		Graviola	1	
Morango		1		
Marca D	Manga	4	0/10	
	Caju	3		
	Graviola	3		
Polpa de fruta congelada pasteurizada	Marca E	Caju	3	0/14
		Goiaba	1	
		Manga	4	
		Acerola	1	
		Abacaxi	5	
Marca F	Açaí	1	0/4	
	Manga	1		
	Goiaba	2		
Marca G	Caju	2	0/5	
	Acerola	1		
	Goiaba	2		

Das 80 amostras de frutas minimamente processadas analisadas, *Listeria* spp. foi encontrada em 4 amostras (5,0%) (Tabela 10). Confirmou-se a presença de *Listeria* spp. em 4,8% (2/45) das amostras analisadas pertencentes ao Local A, aqueles isolados foram encontrados em uma amostra de melão *Orange* e uma de coco ralado, no Local B a ocorrência deste micro-organismo foi de 4,0% (1/25) sendo encontrado em uma amostra de seleta de frutas, e no Local C a ocorrência foi de 33,3% (1/3), encontrado em uma amostra de melão Gália. Os locais D e E não apresentaram ocorrência de *Listeria* spp. em nenhuma das amostras.

Tabela 10. Número de amostras de frutas minimamente processadas adquiridas nos diferentes estabelecimentos comerciais.

Produto	Local	Amostras	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras positivas para <i>Listeria</i> spp. (%)
Fruta minimamente processada	A	Melão Orange*	7	2 (4,8)
		Melão Gália	3	
		Melão Amarelo	1	
		Seleta de frutas	15	
		Abacaxi	7	
		Melancia	4	
		Coco*	5	
	B	Abacaxi	8	1 (4,0)
		Melão amarelo	2	
		Melão Orange	2	
		Melão Gália	2	
		Mamão	3	
		Melancia	5	
	C	Seleta de frutas*	3	1 (33,3)
		Mamão	2	
	D	Melão Gália*	1	0 (0,00)
		Mamão	3	
		Melão Amarelo	2	
	E	Melão Orange	2	0 (0,00)
		Abacaxi	2	
Mamão		1		

*Amostras com isolados positivos para *Listeria* spp.

Das quatro amostras positivas para *Listeria* spp., foram isoladas 27 culturas. Tais isolados foram obtidos mediante metodologia tradicional (PAGOTTO et al., 2011), em que se observaram características típicas para a identificação de *Listeria* spp., como o crescimento bacteriano nos meios Oxford e Palcam, técnica de Gram e testes bioquímicos de motilidade, produção de catalase e fermentação dos carboidratos.

Para a identificação da espécie *L. monocytogenes* foram realizadas análises para detecção do gene *hlyA* por PCR convencional nos 27 isolados de *Listeria* sp. Os resultados apresentados na Figura 4 mostraram que dos 27 isolados, detectou-se a presença do gene do fator hemolítico em uma amostra de melão Gália com 7 isolados (25,9%) e uma de melão Orange com 2 isolados (7,4%), produzindo produtos de 858 bp após amplificação do gene *hlyA*.

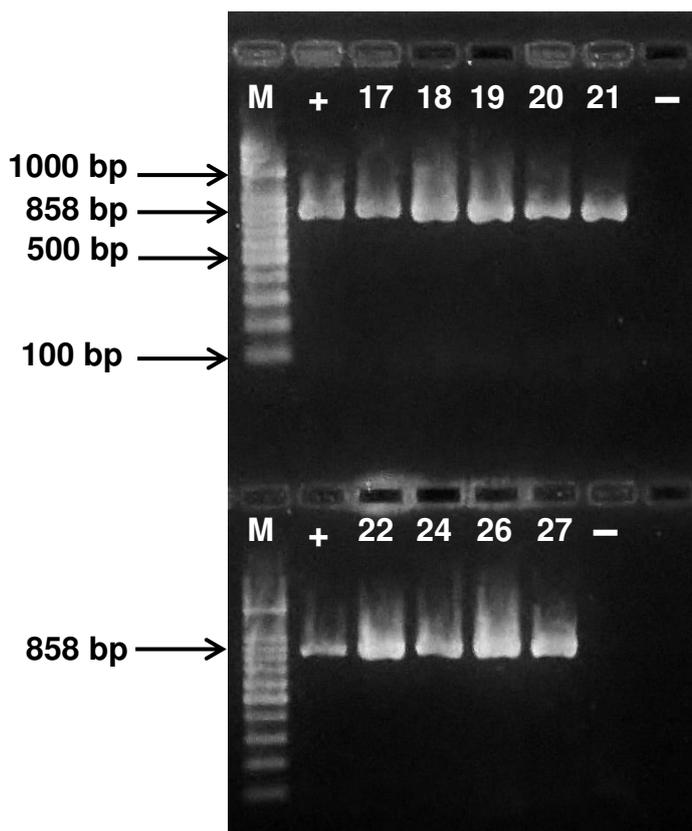


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do gene *hlyA* com os isolados positivos de *L. monocytogenes*. **Colunas:** M marcador de peso molecular de 100 bp; + controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 7644); 17, 18, 19, 20, 21, 22, 26, isolados positivos de Melão Gália; 24, 27 isolados positivos de Melão Orange; - controle negativo.

A ocorrência da doença é importante por sua alta letalidade o que causa uma preocupação das autoridades responsáveis pelo controle sanitário e da comunidade científica, a fim de aumentar a segurança dos alimentos (RIBEIRO et al., 2016). São poucos os dados relativos à ocorrência de *Listeria* spp. em frutas, porém o patógeno pode estar presente em ambientes industriais, principalmente se o ambiente estiver molhado ou úmido, e também em equipamentos formando biofilme, dessa forma a habilidade de se desenvolver em pH baixo e ambientes com baixa temperatura facilita a sua ocorrência em frutas e sucos ácidos (KIM; CHO, 2010). No entanto, existe uma baixa prevalência do patógeno em frutas, devido ao fato da maioria das frutas crescerem em árvores ou acima do solo, portanto o contato das frutas com o solo, água ou fezes contaminadas com *L. monocytogenes* é menos frequente (BRACKETT, 2007).

As frutas minimamente processadas precisam de temperatura de refrigeração para sua estocagem, favorecendo a sobrevivência e multiplicação de *L. monocytogenes* pela característica psicotrófica que apresenta. Assim também, o patógeno tem como característica a capacidade de formação de biofilmes em associação com outros micro-organismos, tornando-o resistente à desinfecção (RUIZ-BOLIVAR et al., 2008; BYRNE et al., 2016). Desta maneira, o controle do micro-organismo em vegetais e frutas minimamente processadas continua sendo difícil, pois *L. monocytogenes* se adapta a diferentes tipos de meio e apresenta particularidades como a sobrevivência e multiplicação em temperaturas de refrigeração que tornam complicado o controle tanto no produto como em plantas de processamento (DESTRO, 2006).

Os resultados da ocorrência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* estão apresentados como segue na Tabela 11.

Tabela 11. Ocorrência de *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* em polpas de frutas congeladas e frutas minimamente processadas.

Polpa de fruta congelada	Nº de amostras	Nº de amostras positivas para <i>Listeria</i> sp.	Fruta minimamente processada	Nº de amostras	Nº de amostras positivas para <i>Listeria</i> sp. (%)	Nº de amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i> (%)
Caju	14	0	Melão Orange	11	1 (9,1%)	1 (9,1%)
Goiaba	7	0	Melão Amarelo	5	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Abacaxi	5	0	Melão Gália	6	1 (16,7%)	1 (16,7%)
Morango	8	0	Melancia	9	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Acerola	9	0	Mamão	9	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Manga	18	0	Abacaxi	17	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Graviola	7	0	Seleta de frutas*	18	1 (5,6%)	0 (0,0%)
Açaí	7	0	Coco ralado	5	1 (20,0%)	0 (0,0%)
Coco	5	0				
TOTAL	80	0	TOTAL	80	4 (5,0%)	2 (2,5%)

*seleta de frutas: kiwi, manga, melão, morango, abacaxi.

Vojkovska et al. (2017), analisaram a prevalência e caracterização de *Salmonella* spp, MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) e *L. monocytogenes*, em frutas, vegetais e brotos comercializados em 9 cidades na República Tcheca coletas durante o ano 2014. Os resultados mostraram que *L. monocytogenes* foi encontrada em 2 das 339 amostras analisadas (rúcula e espinafre), advertindo sobre deficiências nas práticas de higiene durante a colheita, processamento e distribuição de produtos prontos para o consumo, tornando-os susceptíveis à contaminação por patógenos.

Um estudo realizado por Souza (2014) avaliou a prevalência de *Listeria* sp. em amostras de melão (150 amostras) e jabuticaba (60 amostras), adquiridas no comércio varejista do Município de Viçosa – MG, Brasil. De igual forma confirmou a presença deste micro-organismo em 9,33% (14/150) das amostras de melão e por reação de PCR revelou a presença de apenas um isolado (0,47% do total de amostras) de *L. monocytogenes*, o que sugere que o melão é uma fonte potencial de transmissão deste patógeno.

É preocupante a presença deste patógeno em melões minimamente processados, visto que, este produto é consumido diretamente sem necessidade de realizar qualquer tipo de tratamento térmico, podendo assim provocar casos e surtos de grande relevância como o acontecido em 2011 nos Estados Unidos, relacionado com o consumo de melões contaminados (CDC, 2011).

Embora os isolados de *Listeria* sp. das amostras de seleta de frutas e coco ralado não tenham sido identificados como *L. monocytogenes*, a presença de outras espécies do gênero indica que estes produtos apresentam condições para sobrevivência e/ou multiplicação de *L. monocytogenes* e portanto, devem ser considerados também como possíveis fontes de transmissão do patógeno.

Nossos resultados evidenciam que as técnicas de higienização e manipulação realizadas na produção de melões minimamente processados não foram eficientes e não garantiram a inocuidade do produto para o consumo.

5.3 Caracterização dos genes de virulência *inIA*, *inIB*, *plcA*, *plcB*, *prfA* e *actA*

Para a caracterização genotípica dos isolados de *L. monocytogenes* encontrados nas frutas, selecionaram-se os genes codificadores de Internalina A (*inIA*), responsável pela adesão e entrada da bactéria na célula do hospedeiro; Internalina B (*inIB*), necessária para a internalização em hepatócitos, fibroblastos e células não epiteliais; fosfolipases: fosfolipase C fosfatidilinositol (PI-PLC), codificada pelo gene *plcA* que atua sinergicamente com LLO para destruir a bicamada lipídica do fagossoma e a fosfolipase C fosfatidilcolina (PC-PLC), codificada pelo gene *plcB*, ambas fosfolipases importantes na lise da membrana do vacúolo; proteína PrfA (*prfA*) importante na regulação da expressão das proteínas de virulência; e a proteína actA (*actA*) que codifica a proteína de polimerização da actina, e participa na nucleação de cauda para o movimento no interior do citoplasma celular (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; BHUNIA, 2008). Estes genes são característicos de *L. monocytogenes* e são essenciais na infecção intracelular.

A avaliação do potencial de virulência de um determinado isolado é importante, visto que, a ausência de um gene importante no ciclo da infecção do patógeno indica um potencial de virulência reduzido (LOMONACO et al. 2012).

Foram analisados 9 isolados de *L. monocytogenes* correspondentes a uma amostra de melão *Orange* e uma de melão *Gália*. Os resultados evidenciaram a presença dos genes *inIA*, *inIB*, *plcA*, *plcB*, *prfA* e *actA* que estão associados com a virulência do micro-organismo, em 100% dos isolados de *L. monocytogenes* avaliados (Figuras 5, 6, 7, 8, 9 e 10 e Tabela 12). Todos esses genes estão envolvidos no processo de invasão, multiplicação e sobrevivência intracelular, portanto pela presença destes genes, podemos confirmar o potencial patogênico dos isolados devido à presença de todos os genes analisados. Assim os melões analisados e confirmados com a presença de *L. monocytogenes* carreadores de vários genes de virulência, representaram um risco para a saúde da população.

Tabela 12. Características do perfil genético dos isolados de *L. monocytogenes*

Identificação	Fonte	Genes analisados					
		<i>actA</i>	<i>inIA</i>	<i>inIB</i>	<i>plcA</i>	<i>plcB</i>	<i>prfA</i>
AM17		+	+	+	+	+	+
AM18		+	+	+	+	+	+
AM19	Melão	+	+	+	+	+	+
AM20	Gália	+	+	+	+	+	+
AM21		+	+	+	+	+	+
AM22		+	+	+	+	+	+
AM26		+	+	+	+	+	+
AM24	Melão	+	+	+	+	+	+
AM27	Orange	+	+	+	+	+	+

Neste trabalho não foram identificados perfis de virulência distintos entre os isolados de *L. monocytogenes* de diferente origem de amostra.

O gene *prfA*, essencial na patogenicidade deste micro-organismo, está presente em todas as cepas de *L. monocytogenes* (ausente em *L. innocua* e *L. welshimerii*) e codifica a proteína PrfA que pode regular diretamente 10 genes de virulência. Mutantes de *L. monocytogenes* que não apresentam a proteína PrfA, não tem a capacidade de se replicar na célula hospedeira nem de se espalhar célula-célula (VERA et al., 2013).

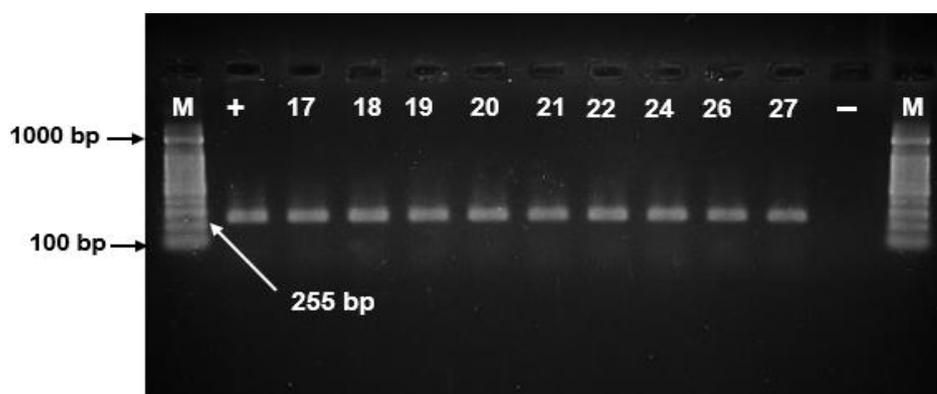


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do gene *inIA* com os isolados positivos de *L. monocytogenes*. **Colunas:** M marcador de peso molecular de 100 bp; + controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 7644); 17, 18, 19, 20, 21, 22, 26, isolados positivos de Melão Gália; 24, 27 isolados positivos de Melão Orange; - controle negativo.

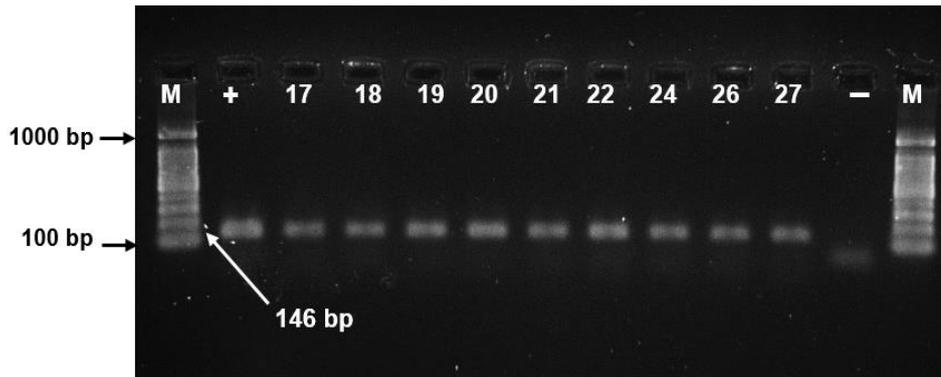


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do gene *inlB* com os isolados positivos de *L. monocytogenes*. **Colunas:** M marcador de peso molecular de 100 bp; + controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 7644); 17, 18, 19, 20, 21, 22, 26, isolados positivos de Melão Gália; 24, 27 isolados positivos de Melão Orange; - controle negativo.

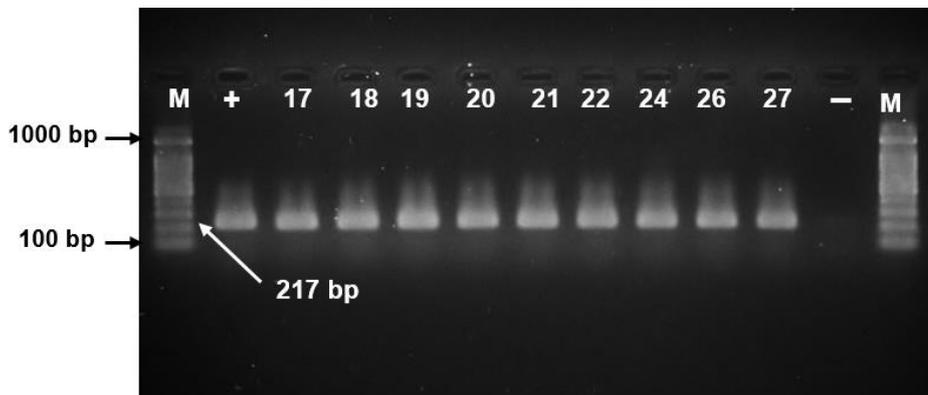


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do gene *prfA* com os isolados positivos de *L. monocytogenes*. **Colunas:** M marcador de peso molecular de 100 bp; + controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 7644); 17, 18, 19, 20, 21, 22, 26, isolados positivos de Melão Gália; 24, 27 isolados positivos de Melão Orange; - controle negativo.

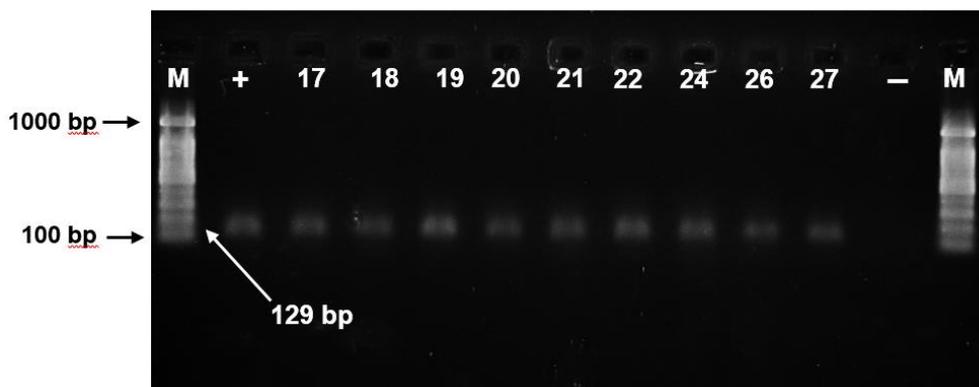


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do gene *plcA* com os isolados positivos de *L. monocytogenes*. **Colunas:** M marcador de peso molecular de 100 bp; + controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 7644); 17, 18, 19, 20, 21, 22, 26, isolados positivos de Melão Gália; 24, 27 isolados positivos de Melão Orange; - controle negativo.

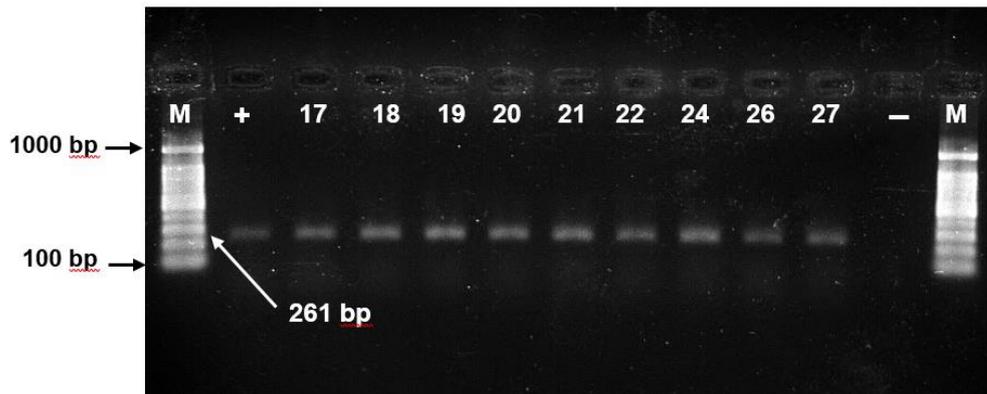


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do gene *plcB* com os isolados positivos de *L. monocytogenes*. **Colunas:** M marcador de peso molecular de 100 bp; + controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 7644); 17, 18, 19, 20, 21, 22, 26, isolados positivos de Melão Gália; 24, 27 isolados positivos de Melão Orange; - controle negativo.

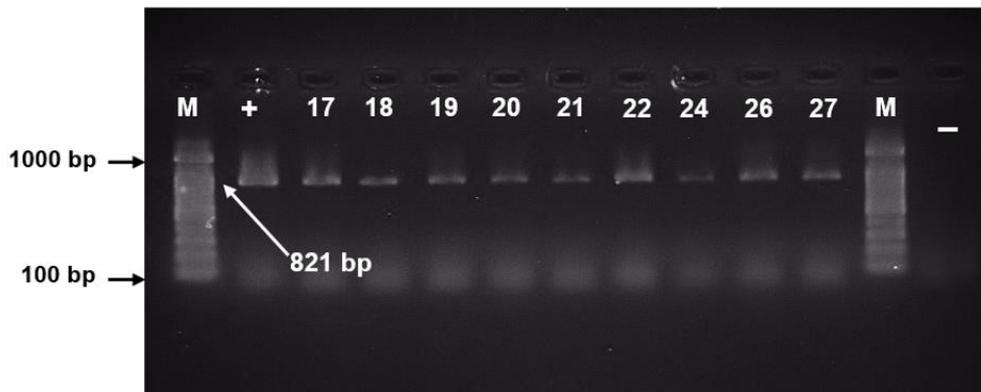


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do gene *actA* com os isolados positivos de *L. monocytogenes*. **Colunas:** M marcador de peso molecular de 100 bp; + controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 7644); 17, 18, 19, 20, 21, 22, 26, isolados positivos de Melão Gália; 24, 27 isolados positivos de Melão Orange; - controle negativo.

O gene *actA* apresenta um polimorfismo alélico. Mediante estudos de polimorfismo alélico dos genes de virulência Wiedmann et al., (1997) e Moriishi et al., (1998) revelaram que o gene *actA* apresenta 2 tipos de alelos denominados tipos 3 e 4, apresentando 3 e 4 regiões de PRRs (*Proline Rich Repeats*), respectivamente. A presença de polimorfismo neste gene determina uma diferença no nível de virulência nestes isolados. Todos os isolados foram identificados com o gene *actA* tipo 3, com amplificação de 821 bp pela PCR aplicada (Figura 10).

No Brasil, não foram encontrados estudos que visam a detecção de fatores de virulência de *L. monocytogenes* em frutas.

Kabuki et al. (2004) rastrearam os padrões de contaminação de *L. monocytogenes* em plantas de processamento de queijo fresco tipo latino, na cidade de Nova Iorque, EUA, sendo coletadas as amostras em um período de 6 meses, avaliando 36 isolados do patógeno em amostras de queijo e sendo revelado que 24 isolados pertenciam à linhagem I (*actA* tipo 4 e *hly* tipo 1).

Na avaliação da patogenicidade de *L. monocytogenes* em amostras de Ricota comercializadas em Campinas coletadas em três períodos diferentes do ano, Esper et al. (2011) observaram que 100% dos isolados apresentaram o gene *actA* tipo 4. Em amostras de creme de leite pasteurizado coletadas de comércios de Campinas tipo alélico 4 também foi detectado por Martins et al. (2009).

Lomonaco et al. (2012) encontraram a presença de todos os genes *actA*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *prfA*, *hlyA* e *iap* em 51 de 53 isolados obtidos de amostras de queijo Gorgonzola coletadas entre 2004 a 2007 nas regiões de Piedmont e Lombardy na Itália, a presença desses genes foi avaliada também usando PCR convencional.

Um estudo executado por Soni et al. (2014) avaliou a virulência e caracterização genotípica de 30 isolados de *L. monocytogenes* obtidos de amostras vegetais e solo ao longo do período de outubro de 2011 a fevereiro de 2012 em Varanasi, Índia; comprovando que, todos eram positivos para o gene *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *prfA*, *actA*, *hlyA* e *iap*, com exceção de um isolado que não possuía o gene *plcA*.

Os genes de virulência *actA*, *plcA*, *mpl*, *hly*, *iap* e *prfA* também foram detectados em *L. monocytogenes* isolados de frutos do mar tropicais e amostras ambientais da pesca na Índia, indicando que tais genes são importantes para a proliferação intracelular do patógeno, portanto, a presença desses genes nos alimentos é um forte indicador do potencial de virulência (DAS et al., 2013).

5.4 Teste de susceptibilidade de *L. monocytogenes* aos antimicrobianos

Analisou-se o perfil de susceptibilidade dos 9 isolados de *Listeria monocytogenes* provenientes de frutas minimamente processadas frente aos 9 agentes antimicrobianos, representantes de diferentes classes e utilizados pela medicina para o tratamento da doença, pelo método de disco difusão (Figura 11) segundo o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Os resultados do perfil de susceptibilidade estão apresentados na Tabela 12.

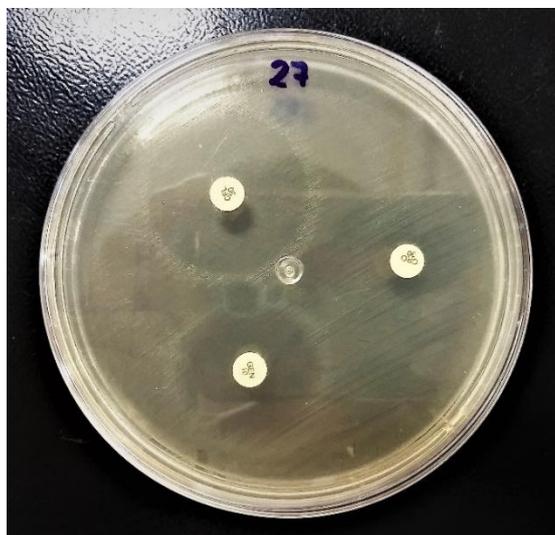


Figura 11. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos de *L. monocytogenes* isolada de amostra de Melão Gália minimamente processado.

Tabela 13. Perfil de susceptibilidade dos isolados de *Listeria monocytogenes* aos antimicrobianos testados.

Antibióticos testados - frequência de isolados resistentes, com resistências intermediárias e sensíveis (%)																												
		AMP			GEN			CLO			CIP			CRO			CFL			SUT			TET			PEN		
AMOSTRA	n	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S			
Melão Gália	7	0	0	100	0	11,1	88,9	0	0	100	0	0	100	100	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	11,1	88,9
Melão Orange	2	0	0	100	0	11,1	88,9	0	0	100	0	0	100	100	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100

AMP- Ampicilina (10 µg); GEN- Gentamicina (10 µg); CLO – Cloranfenicol (30 µg); CIP – Ciprofloxacina (5 µg); CRO – Ceftriaxona (30 µg); CFL – Cefalotina (30 µg); SUT – Sulfazotrim (25 µg); TET – Tetraciclina (30 µg); PEN – Penicilina G (10 U).

n: Total de isolados

R: Resistente.

I: Resistência intermediária.

S: Sensível.

Estudos sobre avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de *L. monocytogenes* em frutas são escassos, mas atualmente existe uma tendência global no monitoramento dos perfis de susceptibilidade dos micro-organismos aos antibióticos (WHO, 2015).

Os 9 isolados de *Listeria monocytogenes* apresentaram 100% de sensibilidade a 6 dos 9 antibióticos testados, tais agentes antimicrobianos foram: ampicilina, ciprofloxacina, tetraciclina, cefalotina, cloranfenicol e sulfametoxazol/trimetoprim. Para gentamicina, 7 isolados apresentaram sensibilidade (77,8%) e 2 (22,2%) uma resistência intermediária, e para Penicilina G, 8 isolados foram susceptíveis (88,9%) e 1 apresentou resistência intermediária (11,1%). Nestes casos que apresentaram resistência intermediária, indica-se a administração de maiores doses dos antibióticos para o tratamento da listeriose. Detectou-se também que todos os isolados apresentaram resistência apenas à ceftriaxona (100%), deste modo pode-se inferir que nenhuma cepa apresentou multirresistência.

Cepas de *L. monocytogenes* resistentes aos antimicrobianos que são geralmente utilizadas no tratamento da listeriose humana podem ser um grande risco a saúde da população, especialmente em indivíduos imunossuprimidos, crianças, idosos e mulheres grávidas (MANTILLA et al., 2007).

À medida que os antimicrobianos estão sendo utilizados indiscriminadamente, o número de bactérias resistentes aos antimicrobianos mais utilizados na terapia humana aumenta consideravelmente. Para o tratamento de infecções por *Listeria* geralmente é administrado ampicilina ou penicilina G, em combinação com um aminoglicosídeo. A associação de trimetoprim com uma sulfonamida, como o sulfametoxazol, é utilizada como segunda escolha de terapia e é geralmente administrada nos casos de doentes alérgicos aos antibióticos da classe β -lactâmicos (CONTER et al., 2009).

Afortunadamente a maioria dos isolados de *L. monocytogenes* neste estudo foi susceptível às penicilinas do grupo dos β -lactâmicos (ampicilina e penicilina G), com exceção de apenas uma cepa que apresentou resistência intermediária para penicilina G, e também todos apresentaram susceptibilidade

para a sulfonamida sulfazotrim (sulfametoxazol/trimetoprim), comprovando que esse antibiótico é uma boa opção terapêutica, caso a terapia de primeira escolha não seja efetiva.

Para o aminoglicosídeo testado (gentamicina) observou-se uma resistência intermediária em 22.2% dos isolados. Tais resultados concordaram com Pesavento et al. (2010), que relataram a susceptibilidade de quase todos os isolados de *L. monocytogenes* (com exceção de um), à ampicilina, gentamicina e sulfametoxazol/trimetoprim em amostras de carne e alimentos de varejo. A atividade inibitória e bactericida dos antibióticos testados evidencia que ainda é mantido o perfil de susceptibilidade dos antibióticos de escolha para o tratamento de listeriose.

No Brasil, os antibióticos utilizados como primeira escolha para o tratamento de meningites por *L. monocytogenes* também são ampicilina em combinação com um aminoglicosídeo, ou o uso de ampicilina com penicilina G cristalina. Os antibióticos de segunda escolha utilizados geralmente são cefalosporinas em combinação com ampicilina e também é usado cloranfenicol (BRASIL, 2009).

Neste estudo, foram testados dois agentes antimicrobianos β -lactâmicos: cefalotina e ceftriaxona, pertencentes à classe das cefalosporinas de primeira e terceira geração, respectivamente. Estes antibióticos são de amplo espectro e tem atividade contra micro-organismos Gram positivos e negativos. Muitos estudos relatam que *L. monocytogenes* apresenta uma resistência natural às cefalosporinas (RUIZ-BOLIVAR et al., 2008), sendo constatado neste estudo pela resistência de todos os isolados à ceftriaxona, no entanto, todos os isolados foram susceptíveis à cefalotina. Os resultados da cefalotina mostraram-se de acordo com Cho et al. (2004), que também identificaram a susceptibilidade do patógeno em todos seus isolados.

A ciprofloxacina, um antibiótico da classe das fluoroquinolonas, possui a capacidade de inibir a DNA girase, uma enzima envolvida na replicação, transcrição e reparação de DNA. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas,

determinando a morte dos micro-organismos (SOUZA et al., 2004, BRASIL, 2016).

Todos os isolados testados neste estudo foram susceptíveis a ciprofloxacina. O estudo realizado por Byrne et al. (2016) apresenta resultados similares ao avaliarem a resistência antimicrobiana de *L. monocytogenes* isolada de vegetais frescos e minimamente processados, apresentando da mesma forma todos os isolados, susceptibilidade a ciprofloxacina. Pode-se deduzir que nossos resultados não estão de acordo com o relatado por De Nes et al. (2010) sobre a redução da susceptibilidade de *L. monocytogenes* a esse agente antimicrobiano.

A tetraciclina, que pertence à classe das tetraciclinas, tem boa atividade contra a *L. monocytogenes*. Geralmente é usada no tratamento onde o paciente é alérgico a outros antibióticos. A tetraciclina atua inibindo a síntese proteica em nível ribossômico das bactérias Gram negativas e positivas. As drogas desse grupo estão estreitamente inter-relacionadas e, com poucas exceções, apenas a tetraciclina precisa ser testada de forma rotineira (CLSI, 2012).

Diversos estudos têm demonstrado o efeito da resistência de *Listeria* spp. a tetraciclina, (BERTRAND et al., 2005; SRINIVASAN et al., 2005; SAKARIDIS et al., 2011, GOMEZ et al., 2014). No entanto, neste estudo nenhum isolado foi identificado como resistente, sendo todos os isolados susceptíveis a este agente antimicrobiano, o que coincide com os resultados apresentados por outros autores (ALTUNTAS et al., 2012; COSTA et al., 2013).

Não foram encontrados estudos relacionados com a resistência antimicrobiana de *L. monocytogenes* isoladas de frutas, no entanto, alguns autores avaliaram tal resistência em isolados de vegetais (CHO et al., 2004; COSTA et al., 2013, WU et al., 2015).

No estudo realizado por Cho et al. (2004), foi avaliada a susceptibilidade de *L. monogytogenes* isolada de amostras de vegetais minimamente processados frente aos antibióticos ampicilina, cloranfenicol, cefalotina,

carbenicilina, gentamicina, canamicina, estreptomina, tetraciclina e tobramicina. O patógeno apresentou resistência apenas ao ácido nalidíxico.

Sakaridis et al. (2011) relataram a susceptibilidade de *L. monocytogenes* aos seguintes antimicrobianos isolados de carcaças de frango: ciprofloxacina, eritromicina, vancomicina, penicilina, ampicilina, cefalotina, cloranfenicol e gentamicina.

Na pesquisa de Altuntas et al. (2012) foi determinada a susceptibilidade de *L. monocytogenes* isolada de alimentos derivados de animais, aos antibióticos tetraciclina, cloranfenicol, gentamicina, trimetoprim e penicilina.

Estudos realizados por Costa (2013) também demonstraram que todos seus isolados de casos clínicos e alimentos revelaram sensibilidade a ampicilina, cefalotina, ciprofloxacina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, penicilina, rifampicina, tetraciclina, sulfametoxazol/trimetoprim e vancomicina e resistência apenas à ceftioxima.

6. CONCLUSÕES

L. monocytogenes não foi isolada de amostras de polpas de frutas, portanto, estes produtos apresentam um baixo risco de transmissão de listeriose,

L. monocytogenes foi detectada em 2 amostras de melão minimamente processado, Gália e Orange, respectivamente, sendo estas frutas uma potencial fonte de transmissão de *L. monocytogenes*. Dessa forma, medidas de controle durante a produção de melões minimamente processados devem ser adotadas para minimizar o risco de prevalência deste patógeno. A ocorrência deste patógeno em melões exibe um risco à saúde pública, uma vez que os melões minimamente processados são consumidos diretamente sem tratamentos prévios que garantam a inocuidade do alimento, como o tratamento térmico.

Nossos resultados evidenciam que as técnicas de higienização e manipulação realizadas para a produção de melões minimamente processados não foram eficientes e não garantiram a inocuidade do produto para o consumo.

Todos os isolados de *L. monocytogenes* provenientes das amostras de melões apresentaram os genes de virulência *inlA*, *inlB*, *plcA*, *plcB*, *prfA* e *actA*, evidenciando um grande potencial de virulência que pode ocasionar uma infecção severa ao consumidor.

Em relação ao perfil de susceptibilidade dos antibióticos, os resultados mostraram uma alta frequência de isolados de *L. monocytogenes* susceptíveis aos antibióticos testados, sendo que todos foram 100 % susceptíveis a 6 antibióticos, utilizados geralmente na terapia de infecções por *L. monocytogenes* (ampicilina, ciprofloxacina, tetraciclina, cefalotina, cloranfenicol e sulfametoxazol/trimetoprim). Todos os isolados foram resistentes a ceftriaxona. Cabe sinalizar que mesmo sendo a maioria dos isolados susceptível aos antibióticos testados, é importante o controle no uso indiscriminado de tais agentes, a fim de evitar a aparição de cepas multirresistentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEJANDRA, V.; DOMINGUEZ, G.; MARLANA, H. B. Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. **Revista Chilena de Infectología**, v. 30, n. 4, p. 407-416, 2013.

ALTUNTAS, E.G.; KOCAN, D.; COSANSU, S.; AYHAN, K.; JUNEJA, V. K.; MATERON, L. Antibiotic and bacteriocin sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different foods. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, p. 363-368, 2012.

BASTOS, M. do S. R. Processamento Mínimo de frutas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006.

BEHRSSING, J.; JAEGER, J.; HORLOCK, F.; KITA, N.; FRANZ, P.; PREMIER, R. Survival of *Listeria innocua*, *Salmonella salford* and *Escherichia coli* on the surface of fruit with inedible skins. **Postharvest Biology and Technology**, v. 29, n. 3, p. 249-256, 2003.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. **Listeria: A practical approach to the organism and its control in foods**, 2nd. Blackwell, Oxford, 2005.

BERTRAND, S.; HUYS, G., YDE, M.; D'HAENE, K.; TARDY, F.; VRINTS, M.; SWINGS, J.; COLLARD, J. Detection and characterization of tet(M) in tetracycline resistant *Listeria* strains from human and food-processing origins in Belgium and France. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 1151-1156, 2005.

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

BHUNIA, A. K. **Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis**. Ed. Springer, p. 290, 2008.

BORGES, M. F.; ANDRADE A. P. C.; ARCURI, E. F.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y. *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos. **Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical**. p. 31, 2009.

BRACKETT, R. Incidence and Behavior of *Listeria monocytogenes* in Products of Plant Origin, **Listeria, Listeriosis, and Food Safety**. 3 ed. CRC Press, chap. 16, p. 655–680, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa Nº 1, de 7 de janeiro de 2000. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de frutas. **Diário Oficial da União**, Nº 6, Brasília, 10 de janeiro de 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001. **Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7^a. ed. Brasília: Ministério da Saúde, p. 541 – 569, 2009.

BRASIL. ANVISA. **Antimicrobianos - bases teóricas e uso clínico**. 2016.

Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/pas_web/modulo1/quinolonas2.htm>. Acesso em: 10 jul. 2017.

BYRNE, V. D. V.; HOFER, E., VALLIM, D. C.; ALMEIDA, R. C. D. C. Occurrence and antimicrobial resistance patterns of *Listeria monocytogenes* isolated from vegetables. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 438-443, 2016.

CABANES, D; DUSSURGET, O; DEHOUX, P; COSSART, P. Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 51, p. 1601–1614, 2004.

CAGGIA, C.; SCIFÒ, G. O.; RESTUCCIA, C.; RANDAZZO, C. Growth of acid-adapted *Listeria monocytogenes* in orange juice and in minimally processed orange slices. **Food Control**, Catania, Itália, v. 20, p. 59-66, 2009.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION – CDC. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Rocky Ford Cantaloupes from Jensen Farms. **Morbidity and Mortality Weekly Reports**, v.29, p. 847-850, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Deadly *Listeria* Outbreak Halted in Record Time. 2014. Disponível em: <http://www.cdc.gov/24-7/savinglives/listeria/>. Acesso em: 15 jul. 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Notes from the Field: Listeriosis Associated with Stone Fruit — United States. 2014. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6410a6.htm>. Acesso em: 12 dez. 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Commercially Produced, Prepackaged Caramel Apples Made from Bidart Bros. Apples. 2015. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/>. Acesso em: 14 dez. 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Frozen Vegetables. 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/frozen-vegetables-05-16/>. Acesso em: 12 dez. 2016.

CHARPENTIER, E.; COURVALIN, P. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 2103-2108, 1999.

CHEN, Y.; BURALL, LS.; LUO, Y.; TIMME, R.; MELKA, D.; MURUVANDA, T.; PAYNE, J.; WANG, C.; KASTANIS, G.; MAOUNOUNEN-LAASRI, A.; DE JESUS, A.J.; CURRY, P.E.; STONES, R.; K'ALUOCH, O.; LIU, E.; SALTER, M.; HAMMACK, T.S.; EVANS, P.S.; PARISH, M.; ALLARD, M.W.; DATTA, A.; STRAIN, E.A.; BROWN, E.W. *Listeria monocytogenes* in stone fruits linked to a

- multistate outbreak: enumeration of cells and whole-genome sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, p. 7030–7040, 2016.
- CHO, S. Y., PARK, B. K., MOON, K. D.; OH, D. H. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and related species in minimally processed vegetables. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 515-519, 2004.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing; Approved standard M02–A11, **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 32, n° 1, 2012.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 21st informational supplement. M100-S21. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 31, n° 1, 2011.
- COCOLIN L, S. S.; NAPPIR, B., CANTONI, C.; COMI, G. Analysis of PCR-based methods for characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 167–178, 2005.
- CONCHA-MEYER, A.; EIFERT, J.; WILLIAMS, R.; MARCY, J.; WELBAUM, G. Survival of *Listeria monocytogenes* on Fresh Blueberries (*Vaccinium corymbosum*) Stored under Controlled Atmosphere and Ozone. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 5; p. 832–836, 2014.
- CONTER, M.; PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; VERGARA, A.; IANIERI, A. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food and food processing environment. **Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma**, v. 17, p. 157-164, 2009.
- CONWAY, W. S.; LEVERENTZ, B.; SAFTNER, R. A. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut apple slices and its interaction with *Glomerella cingulata* and *Penicillium expansum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 177-181, 2000.
- COSSART, P.; TOLEDO-ARANA, A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. **Microbes and Infection**, Paris, v.10, p.1041-1050, 2008.

COSSART, P.; LEBRETON, A. A trip in the "New Microbiology" with the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 588, p. 2437-2445, 2014.

COSTA, D. O.; CARDOSO, G. R.; SILVIA, G. M. V. A evolução do setor produtivo e comercialização de polpa de fruta no brejo paraibano: estudo de caso na coaprodes. XXXIII Encontro nacional de engenharia de produção, 2013. Disponível em:
http://www.abepro.org.br/biblioteca/enegep2013_TN_STP_177_007_22751.pdf. Acesso em: 30 mai. 2017.

COSTA, A. P. R. D. **Caracterização molecular de cepas de *Listeria monocytogenes* de casos clínicos e alimentos no Brasil**. Recife, 2013. Tese (doutorado), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

DANTAS, R. L.; ROCHA, A. P. T.; ARAÚJO, A. S.; RODRIGUES, M. S. A.; MARANHÃO, T. K. L. Qualidade microbiológica de polpa de frutas comercializadas na cidade de Campina Grande/PB. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.14, n. 2, p. 125-130, 2012.

DAS, S.; KUTTANAPPILLY, V. L.; THAMPURAN, N.; POOTHAVALLIL, K. S.; Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from tropical seafood of Kerala, India. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 1093–1098, 2013.

DE LAS HERAS, A.; CAIN R., BIELECKA, M.; VÁSQUEZ- BOLAND, J. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. **Current Opinion in Microbiology**. v. 14, p. 118- 127, 2011.

DE NES, F.; RIBOLDI, G. P.; FRAZZON, A. P. G.; D' AZEVEDO, P. A.; FRAZZON, J. Antimicrobial resistance and investigation of the molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* in dairy products. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 382-385, 2010.

DEN BAKKER, H. C.; WARCHOCKI, S.; WRIGHT, E. M.; ALLRED, A. F.; AHLSTROM, C.; MANUEL, C. S.; STASIEWICZ, M. J.; BURRELL, A.; ROOF,

S.; STRAWN, L. K.; FORTES, E.; NIGHTINGALE, K. K.; KEPHART, D.; WIEDMANN, M. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 1882-1889, 2014.

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

DOUMITH, M.; CAZALET, C.; SIMOES, N.; FRANGEUL, L.; JACQUET, C.; KUNST, F.; MARTIN, P.; COSSART, P.; GLASER, P.; BUCHRIESER, C. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 1072-1083, 2004.

DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R., **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, 3rd ed. ASM Press: Washington D.C., 2007

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA - EMBRAPA. Iniciando um pequeno grande negócio agroindustrial: Polpa e Suco de Frutas. Embrapa Agroindústria de Alimentos, Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, 2003.

ERICSSON, H.; UNNERSTAD, H.; MATTSSON, J. G.; DANIELSSON-THAM, M. L.; THAM, W. Molecular grouping of *Listeria monocytogenes* based on the sequence of the *inlB* gene. **Journal of Medical Microbiology**. v. 49, p. 73–80, 2000.

ERREBO LARSEN, H.; SEELIGER, H. P. R. A mannitol fermenting *Listeria*, *Listeria grayi* sp. **Proceedings of the Third International Symposium on Listeriosis**, Bilthoven, p. 35, 1966.

ESPER, L. M. R.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y. Qualidade microbiológica de ricotas comerciais e os riscos associados à presença de *Listeria*

monocytogenes. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 70, n. 4, p. 554-559, 2011.

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1; 2017. Disponível em:
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.1_Breakpoint_Tables.pdf. Acesso em: 26 ago. 2017.

FLESSA, S.; LUSK, D. M.; HARRIS, L. J. Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101. p. 255-262, 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. 2011 **Environmental assessment: Factors potentially contributing to the contamination of fresh whole cantaloupe implicated in a multi-state outbreak of listeriosis**.

Disponível em:
<http://www.fda.gov/Food/RecallsOutbreaksEmergencies/Outbreaks/ucm276247.htm>. Acesso em: 19 mai. 2016.

FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, 2008. São Paulo: Atheneu, 182p

FURRER, B.; CANDRIAN, V.; HOFELEIN C.; LUTHY, J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by *in vitro* amplification of *haemolysin* gene fragments. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 70, p. 372–379, 1991.

GERMINI, A.; MASOLA, A.; CARNEVALI, P.; MARCHELLI, R. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O175:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. **Food Control**, v. 20, p. 733–738, 2009.

GLASS, K.A.; GOLDEN, M.C.; WANLESS, B.; BEDALE, W.; CZUPRYNSKI, C. 2015. Growth of *Listeria monocytogenes* within a caramel-coated apple microenvironment. **mBio Journal**, v. 6, p. 1- 5, 2015.

GÓMEZ, D.; AZÓN, E.; MARCO, N.; CARRAMIÑANA, J. J.; ROTA, C.; ARIÑO, A.; YANGÜELA, J. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and

Listeria innocua from meat products and meat-processing environment. **Food Microbiology**, v. 42, p. 61-65, 2014.

GOYENECHE, R.; AGÜERO, M. V.; ROURA, S.; SCALA, K. D. Application of citric acid and mild heat shock to minimally processed sliced radish: Color evaluation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 93, p. 106-113, 2014.

GRAVES, L. M.; HELSEL, L. O.; STEIGERWALT, A. G.; MOREY, R. E.; DANESHVAR, M. I.; ROOF, S. E.; ORSI, R. H.; FORTES, E. D.; MILILLO, S. R.; DEN BAKKER, H. C.; WIEDMANN, M., SWAMINATHAN, B.; SAUDERS, B. D. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p.1280-1288, 2010.

GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, B. Pulse Net standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 55 -62, 2001.

GRAVESEN, A.; JACOBSEN, T.; MØLLER, P. L.; HANSEN, F.; LARSEN, A. G.; KNØCHEL, S. Genotyping of *Listeria monocytogenes*: comparison of RAPD, ITS, and PFGE. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, p. 43-51, 2000.

GUERRA, M. M.; BERNARDO, F.; MCLAUHLIN, J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, p. 456-461, 2002.

HOF, H.; NICHTERLEIN, T.; KRETSCHMAR, M. Management of listeriosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 345- 357, 1997.

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 4. ed. São Paulo: IMESP, 2005.

INTEC, Assessoria e Consultoria em Gestão Estratégica. **Estudo de Viabilidade Técnica e Econômica para Abertura de uma Agroindústria Processadora de Polpa de Frutas no Município Aimorés - MG**. Viçosa, 2005.

JARADAT, Z. W.; SCHUTZE, G. E.; BHUNIA, A. K. Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meat products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, p.1-10, 2002.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, p. 517-542, 2005.

JOHANNESSEN, G.S.; LONCAREVIC, S.; KRUSE, H. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 199–204, 2002.

KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latinstyle fresh-cheese processing plants. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2803-2812, 2004.

KIM, H.; CHO, J. Simple and rapid detection of *Listeria monocytogenes* in fruit juice by real-time PCR without enrichment culture. **Food Control**, v. 21, p. 1419-1523, 2010.

KOPF, C. **Técnicas do processamento de frutas para a agricultura familiar / Departamento de Engenharia de Alimentos**. Guarapuava: Unicentro, 2008.

KOVACEVIC, J.; MESAK, L. R.; ALLEN, K. J. Occurrence and characterization of *Listeria* spp. in ready to-eat retail foods from Vancouver, British Columbia. **Food Microbiology**, v. 30, p. 372-378, 2012.

- KUHN, M.; SCORTTI, M.; VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; **Handbook of *Listeria monocytogenes***. New York: CRC Press, 2008.
- KUSSEL-ANDERMANN, P.; EL-AMRAOUI, A.; SAFIEDDINE, S.; NOUAILLE, S.; PERFETTINI, I.; LECUIT, M.; COSSART, P.; WOLFRUM, U.; PETIT, C. Vezatin, a novel transmembrane protein, bridges myosin VIIA to the cadherin-catenins complex. **The Embo Journal**. v. 19, p. 6020-6029, 2000.
- LANG HALTER, E.; NEUHAUS, K.; SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p.641-647, 2013.
- LECLERCQ, A.; CLERMONT, D.; BIZET, C.; GRIMONT, P. A. D.; ROCHE, S.M.; BUCHRIESER, C.; CADET-DANIEL, V.; LE MONNIER, A., et al. *Listeria rocourtiae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 2210-2214, 2010.
- LEIMEISTER-WACHTER, M.; DOMANN, E.; CHAKRABORTY, T. Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is coordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 361–366, 1991.
- LIU, D.; LAWRENCE, M.L.; WIEDMANN, M.; GORSKI, L.; MANDRELL, R.E.; AINSWORTH, A.J.; AUSTIN, F.W. *Listeria monocytogenes* subgroups IIIA, IIIB, and IIIC delineate genetically distinct populations with varied pathogenic potential. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 4, p. 4229–4233, 2006.
- LOMONACO S.; PATTI R.; KNABEL S. J.; CIVERA T. Detection of virulence-associated genes and epidemic clone markers in *Listeria monocytogenes* isolates from PDO Gorgonzola cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 1, p. 76–79, 2012.
- LUNGU, B.; O' BRYAN, C.A.; MUTHAIYAN, A.; MILILLO, S.R.; JOHNSON, M.G., GRANDALL P.G., RICKE S.C. *Listeria monocytogenes*: antibiotic resistance in food production. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, p. 569-578, 2011.

MADDEN, J. M. Microbial Pathogens in fresh produce- the regulatory perspective. **Journal of Food Protection**, v. 55, p. 821-823, 1992.

MANTILLA, S. P. S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; SANTOS, E. B.; GOUVÊA, R. Ocorrência de *Listeria* spp. em amostras de carne bovina moída comercializadas no município de Niterói, RJ, **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1225-1230, 2007.

MAPA/DAS/DIPOA/DCI – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/ Secretaria de Defesa Agropecuária/ Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal/ Divisão de Controle do Comércio Internacional. **Especificação da Decisão da Comissão nº 2001/471/CE**, Brasília, 2002.

MARIAN, M. N.; SHARIFAH AMINAH, S.M.; ZURAINI, M.I.; SON, R.; MAIMUNAH, M.; LEE, H. Y. MPN-PCR detection and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from raw and ready-to-eat foods in Malaysia. **Food Control**, v. 28, p. 309-314, 2012.

MARTINS, I. M.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y. Determination and characterization of pathogens found in dairy products. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 3, p. 359-365, 2009.

MONTEIRO, C. S.; BALBI, M. E.; MIGUEL, O. G.; PENTEADO, P. D. S.; HARACEMIV, S. M. C. Qualidade nutricional e antioxidante do tomate “tipo italiano”. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n.1, p. 25-31, 2008.

MORENO, L. Z. Pesquisa de genes de virulência em cepas de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* originárias de carne suína e ambiente de abatedouros e açougues. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013

MORIISHI, K.; TERAQ, M.; KOURA, M.; INOUE, S. Sequence analysis of the *actA* gene of *Listeria monocytogenes* isolated from human. **Microbiology and Immunology**, v.42, p.129-132, 1998.

MORVAN, A.; MOUBARECK, C. A.; LECLERCQ, A.; HERVÉ-BAZIN, M.; BREMONT, S.; LECUIT, M.; COURVALIN, P.; LE MONNIER, A. Antimicrobial

Resistance of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Humans in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 2728–2731, 2010.

MORETTI, C. L. Manual de processamento mínimo de frutas e hortaliças, Brasília: Embrapa Hortaliças, SEBRAE, p. 531, 2007.

NORTON, D.; M.; McCAMEY, M. A.; 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 environmental. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 3, p. 343-346, 2000.

OLIVEIRA, M.; ABADIAS, M.; USALL.; TORRES, R.; TEIXIDO, N.; VINAS, I. Application of modified atmosphere packaging as a safety approach to fresh-cut fruits and vegetables: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n. 1, p. 13-26, 2015.

ORSI, R.; DEN BAKKER, H.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic Characteristics. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, p. 79-96, 2011.

PAGOTTO, F.; HÉBERT, K.; FARBER, J. MFHPB-30 - Isolation of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. from foods and environmental samples. In: Compendium of Analytical Methods, Volume 2. **Health Canada**. 2011.

PENTEADO, A. L.; LEITÃO, M. Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps. **International Journal of Food Microbiology**, Campinas, SP, v. 92, p. 84-94, 2004.

PESAVENTO, G.; DUCCI, B.; NIERI, D.; COMODO, N.; LO NOSTRO, A. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. **Food Control**, v. 21, p. 708-713, 2010.

PIRIE, J. H. The genus *Listerella* Pirie. **Science**, v. 91, p. 383, 1940.

PIZARRO-CERDA, J., COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell**. v. 24, p. 715–72, 2006.

POYART-SALMERON, C.; CARLIER, C.; TRIEU-CUOT, P.; COURTIEU, A. L.; COURVALIN, P. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. **Lancet**, v. 335, p. 1422-1426, 1990.

POYART-SALMERON, C.; TRIEU-CUOT, P.; CARLIER, C.; MACGOWN, A.; MCLAUCHLIN, J.; COURVALIN, P. Genetic basis of tetracycline resistance in clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 463–466, 1992.

RAIMUNDO, K.; MAGRI, R. S.; SIMIONATO, E. M. R. S.; SAMPAIO, A. C. Avaliação física e química da polpa de maracujá congelada comercializada na Região de Bauru. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.31, n. 2, p. 539-542, 2009.

RAWOOL, D. B.; DOIJAD, S.P.; NEGI, M.; KALE, S. B.; MALIK, S. V.; KURKURE, N. V.; CHAKRABORTY, T.; BARBUDDHE, S B. A multiplex PCR for detection of *Listeria monocytogenes* and its lineages. *Journal of Microbiological Methods*, v. 130, p. 144-147, 2016.

REIS, C.M.; BARBOSA, A.V.; RUSAK, L.A.; VALLIM, D.C.; HOFER, E. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* human strains isolated from 1970 to 2008 in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina**, v. 44, n. 2. P. 173-176, 2011.

RIBEIRO, S. H., GIANOGLU, F. M.; CAMPOS, M. F.; GRACIANO, E. M. A.; TOLEDO, R. C. C. Listeriose: uma doença de origem alimentar pouco conhecida no Brasil. **Higiene alimentar**, v. 30, p. 17-20, 2016.

ROBERTS, A.; NIGHTINGALE, K.; JEFFERS, G.; FORTES, E.; KONGO, J. M.; WIEDMANN, M. Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. **Microbiology**, v. 152, p. 685–693, 2006.

ROCOURT, J.; GRIMONT, P. A. D. *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 33, p. 866-869, 1983.

RODRIGUEZ-LAZARO, D.; JOFRE, A.; AYMERICH, T.; HUGAS, M.; PLA, M. Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by

real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p.6299-6301, 2004.

ROUSSEAU, S.; OLIER, M.; LEMAÎTRE, J.P.; PIVETEAU, P.; GUZZO, J. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism of *inlA* for rapid screening of *Listeria monocytogenes* strains deficient in the ability to invade Caco-2 cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2180–2185, 2004.

RUIZ-BOLIVAR, Z.; POUTOU, R. A.; CARRASCAL, A.K. Resistencia antimicrobiana y a desinfectantes de *Listeria* spp. **Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas**; v. 6, n. 10, p. 101-236, 2008.

RUIZ-BOLIVAR, Z.; NEUQUE-RICO, M. C.; POUTOU-PIÑALES, R. A.; CARRASCAL-CAMACHO, A. K.; MATTAR, S. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* food isolates from different cities in Colombia. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, p. 913-919, 2011.

SADO, P. N.; JINNEMAN, K. C.; HUSBY, G. J.; SORG, S. M.; OMIECINSKI, C. J. Identification of *Listeria monocytogenes* from unpasteurized apple juice using rapid test kits. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1119-1202, 1998.

SAKARIDIS, I.; SOULTOS, N.; IOSSIFIDOU, E.; PAPA, A.; AMBROSIADIS, I.; KOIDIS, P. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated in chicken slaughterhouses in Northern Greece. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 6, p. 1017–1021, 2011.

SALAZAR, J.; CARSTENS, C; BATIHJA, V.; NARULA, S.; PARISH, M.; TORTORELLO, M. Fate of *Listeria monocytogenes* in fresh apples and caramel apples. **Journal of Food Protection**, v. 79, p. 696-702, 2016.

SALEH-LAKHA, S.; ALLEN, V.G.; LI, J.; PAGOTTO, F.; ODUMERU, J.; TABOADA, E.; et al. Subtyping of a large collection of historical *Listeria monocytogenes* strains from Ontario, Canada, by an improved multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA). **Applied and Environmental Microbiology**. v. 79, n. 20, p. 6472-6480, 2013.

SEBASTIANY, E.; REGO, E. R.; VITAL, M. J. S. Qualidade microbiológica de Polpas de frutas congeladas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 68, n. 2, p. 224-231, 2009.

SEELIGER, H. P. R. A pathogene Listerien: *L. innocua* sp.n. (Seeliger et Schoofs, 1977). **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene I Abt Original A**, v. 249, p. 487–493, 1981.

SEELIGER, H. P. R.; ROCOURT, J.; SCHRETTENBRUNNER, A.; GRIMONT, P. A. D.; JONES, D. *Listeria ivanovii* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, n. 3, p. 336-337, 1984.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE. Hortaliças minimamente processadas: Estudo de Mercado SEBRAE, ESPM 2008.

SILVA, E. O.; PINTO, P. M.; JACOMINO, A. P.; SILVA, L. T. Processamento mínimo de produtos hortifrutícolas. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011.

SONI, D. K.; SINGH, M.; SINGH, D. V.; DUBEY, S. K. Virulence and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable and soil samples. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 241, 2014.

SOUZA, M. V. N.; ALMEIDA, M. V.; SILVA, A. D.; COURI, M. R. C. Ciprofloxacina, uma importante fluoroquinolona no combate ao antraz. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 85, n. 1, p. 13-18, 2004.

SOUZA, P. B. A. **Avaliação de *Listeria monocytogenes* em melão e jabuticaba**, Viçosa, 2014. Tese (mestrado), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2014.

SRINIVASAN, V.; NAM, H. M.; NGUYEN, L. T.; TAMILSELVAN, B.; MURINDA, S. E.; OLIVER, S. P. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 2, p. 201- 211, 2005.

STACHI, N. O. **Microbiologia Veterinaria**. Buenos Aires, Intermedica, 2007. p. 571.

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

TOLENTINO, V.R.; GOMES, A. Processamento de vegetais – Frutas e Polpa congelada. **Manual técnico nº 12**, Niterói, 2009.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F., MARTINEZ, M. B., CAMPOS, L.C., GOMPERTZ, O.F.; RÁCZ, M.L. **Microbiologia**. 5 ed: Atheneu, 2008.

TRESSELER, J. K.; FIGUEIREDO, E. A. T.; MACHADO, T. F.; DEFINO, C. M.; SOUSA, P. H. M. Avaliação da qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1722 -1727, 2009.

TROXLER, R.; VON GRAEVENITZ, A.; FUNKE, G.; WIEDEMANN, A.; STOCK, I. Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, p. 525-535, 2000.

UCHIMA, C. A.; CASTRO, M. F. P. M. de; GALLO, C. R.; REZENDE, A. C. B.; BENATO, E. R.; PENTEADO, A. L. Incidence and growth of *Listeria monocytogenes* in persimmon (*Diospyros kaki*) fruit. **Food Microbiology**, v. 126, p. 235-239, 2008.

UKUKU D. O; FETT W. Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated on cantaloupe surfaces and efficacy of washing treatments to reduce transfer from rind to fresh-cut pieces. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 6, p. 924-30, 2002.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A.; KOCKS, C.; DRAMSI, S.; OHAYON, H.; GEOFFROY, C.; MENGAUD, J.; COSSART, P. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 219–230, 1992.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J, KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 584– 640. 2001.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A., KRYPTOTOU, E., SCORTTI, M. *Listeria* placental infection. **mBio Journal**, v.8, n. 3, p. 1-6, 2017.

VELGE, P.; ROCHE, S. Variability of *Listeria monocytogenes* virulence: a result of the evolutionary between saprophytism and virulence?. **Future Microbiology**, v. 5, p. 1799-1821, 2010.

VERA A, GONZÁLEZ G, DOMÍNGUEZ M. Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. **Revista Chilena de Infectología**, v. 30, n. 4, p. 407-416, 2013.

VINES, A.; SWAMINATHAN, B. Identification and characterization of nucleotide sequence differences in three virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes* strains representing clinically important serotype. **Current Microbiology**, v. 36, p. 309–318, 1998.

VITULLO, M.; GRANT, K.; SAMMARCO, M.; TAMBURRO, M.; RIPABELLI, G.; AMAR, C. Realtime PCRs assay for serogrouping *Listeria monocytogenes* and differentiation from other *Listeria* spp. **Molecular and Cellular Probes**, v. 27, p. 68-70, 2013.

VOJKOVSKA, H.; MYSKOVA, P.; GELBICOVA, T.; SKOCKOVA, A.; KOLACKOVA, I.; KARPISKOVA, R. Occurrence and characterization of food-borne pathogens isolated from fruit, vegetables and sprouts retailed in the Czech Republic. **Food Microbiology**, v. 63, p. 147-152, 2017.

VON BREYMANN, J.; CHAVES, C.; ARIAS; M. L. Análisis de la calidad microbiológica y potencial presencia de *Listeria monocytogenes* en pulpas de guanábana (*Annona muricata*), mango (*Mangifera indica*) y maracuyá (*Passiflora edulis*) costarricenses. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 63, n. 1, p. 53-57, 2013.

WELLER, D.; ANDRUS, A.; WIEDMANN, M.; DEN BAKKER, H. C. *Listeria booriae* sp. nov., and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the United States. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 286-292, 2015.

WIEDMANN, M.; BRUCE, J. L.; KEATING, C.; JOHNSON, A. E.; MCDONOUGH, P. L.; BATT, C. A. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 2707–2716, 1997.

WIEDMANN, M. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 2, p. 524-531, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System: Manual for Early Implementation., 2015. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/188783/1/9789241549400_eng.pdf?ua=1. Acesso em: 22 jun. 2017.

WU, S.; WU, Q.; ZHANG, J.; CHEN, M.; YAN, Z.; HU, H. *Listeria monocytogenes* Prevalence and Characteristics in Retail Raw Foods in China. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, 2015.