



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE AGRONOMIA "ELISEU MACIEL"  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL

EDITAL MEC/CAPES e MCT/FINEP  
Programa Nacional de Pós-Doutorado - PNPD/2009

Seleção pública de propostas de projetos de pesquisa e desenvolvimento voltados ao  
Programa Nacional de Pós-Doutorado - PNPD

Projeto *Inserção de Jovens Doutores nas Linhas de Pesquisa em C&T de Frutas e Hortaliças e de Microbiologia Agroindustrial do PPGCTA/UFPEL*

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial (PPGCTA)  
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA)  
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM)  
Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Detalhamento dos Subprojetos:

Identificação da Proposta - pág 02.

Subprojeto I - pág. 06.

Subprojeto II - pág 11.

Obs.: Os subprojetos estão anexados na íntegra no item **Proposta de Projeto**.

Pelotas, 10 de julho de 2009.

Prof. Dr. Jorge Adolfo Silva  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia Agroindustrial  
Coordenador



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE AGRONOMIA “ELISEU MACIEL”  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL

### Identificação de Proposta

**Projeto: Inserção de Jovens Doutores nas Linhas de Pesquisa em C&T de Frutas e Hortaliças e de Microbiologia Agroindustrial do PPGCTA/UFPEL**

**Instituição: UFPEL**

**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial - PPGCTA**

**42003016009P-9**

**Coordenação: Jorge Adolfo Silva**

**UFPEL/FAEM/DCTA**

**Caixa Postal 354**

**96010-900 - Pelotas/RS**

### **O Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial - PPGCTA**

O Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial (PPGCTA) da UFPEL, criado em 1985, em nível de Mestrado e credenciado em 2001, em nível de Doutorado, visa atender a demanda de capacitação de profissionais de nível superior que atuam nas áreas de ensino, pesquisa, extensão e prestação de serviços referentes às atividades do complexo produtivo agropecuário e agroindustrial, envolvendo predominantemente conservação, transformação, padronização, controle de qualidade de matérias-primas, produtos e processos, assim como no desenvolvimento e melhoria de produtos da agroindústria de alimentos.

O PPGCTA tem procurado investir de forma destacada na melhoria da formação acadêmica e de pesquisa e suas inter-relações com o setor agroindustrial e com arranjos produtivos locais. No que diz respeito à formação acadêmica, o Programa oferta anualmente uma programação de disciplinas de formação científica em Ciência e Tecnologia de Alimentos e de disciplinas apoiadoras da formação técnico-científica vinculada às linhas de pesquisa do programa. O PPGCTA tem estimulado e exigido de seus quadros docentes, permanente e colaborador, bem como de seus pesquisadores, o desenvolvimento de disciplinas com bases conceituais atuais e avançadas, com intensa pesquisa bibliográfica em bases mundiais. Nesse caso, a consulta à Base do Portal Periódicos CAPES tem sido incentivada e exigida em todo o contexto acadêmico. Essa atitude e procedimento têm sido adotados também na formação de estudantes de graduação, com destaque para os alunos de Iniciação Científica, sejam eles bolsistas ou não.



Relativamente à formação em pesquisa, todos os projetos de dissertação e de tese estão vinculados às linhas de pesquisa do PPGCTA e são consubstanciadas na inserção que a UFPel tem no contexto regional, com os dois principais Arranjos Produtivos Locais (APL): 1) Produção, Pós-Colheita e Industrialização de Frutas e Hortaliças; e, 2) Produção, Pós-Colheita e Industrialização de Grãos. Complementarmente, duas linhas de pesquisa, com abrangência transversal, perpassam a temática do Programa: 1) Microbiologia Agroindustrial e 2) Qualidade de Alimentos.

Para consolidar a formação em pesquisa, o Programa tem exigido dos estudantes de Mestrado a estruturação do projeto de pesquisa no primeiro semestre do curso, com definição clara da problemática a ser abordada (com respectivo suporte teórico demonstrando relevância, atualidade e contribuição para os avanços em C&T), das hipóteses, dos objetivos, das estruturas de material e de métodos, da equipe de pesquisa, de cronograma e orçamento, bem como dos resultados e impactos previstos. Na condução dos projetos, o PPGCTA tem monitorado a evolução através de exigência de relatórios semestrais e de uma avaliação por comitê técnico-científico. Para os estudantes do Curso de Doutorado a sistemática é similar, excetuando-se o fato de que, para o ingresso, o(a) candidato(a) já apresenta uma proposta de projeto de tese completo, como parte do processo seletivo.

Num contexto de causa-efeito, para haver evolução significativa da qualidade da formação acadêmica e de pesquisa, a infra-estrutura de pesquisa ainda precisa ser melhorada. Por isso, TODOS os docentes do PPGCTA têm apresentado projetos de solicitação de apoio financeiro à P&D, principalmente junto ao MCT-CNPq, MDA-CNPq, MAPA-CNPq, FINEP-MCT-CNPq, FAPERGS, SCT-RS, FAO, CT-Infra/FINEP (projeto institucional). Assim, por exemplo, em 2005, com recursos da SCT-RS, a partir de projeto temático coordenado pelo Prof. Moacir Cardoso Elias, qualificaram-se as infra-estruturas de três laboratórios da linha de pesquisa em C&T de Grãos (Laboratório de Secagem, Processamento e Qualidade de Sub-Produtos). Em projeto temático de seleção de cepas produtoras de biopolímeros foram viabilizados recursos para a aquisição de equipamentos visando avaliação de propriedades reológicas dessas macromoléculas, bem como de outros polímeros como amido, pectinas e proteínas. Viabilizaram-se um analisador de textura SMS com acessórios, alveógrafo e *falling number*. Com a participação do PPGCTA, a UFPEL elaborou projeto institucional CT-INFRA (2007-2008) que, com os recursos aprovados, permitiu a aquisição de equipamentos de maior custo, fundamentais para a avaliação de variáveis diferenciadas em projetos de pesquisa. Nesse projeto adquiriram-se *HPLC headspace*, cromatógrafo a gás, ultrafreezer e termociclador com gradiente de temperatura. Ainda em 2008, o PPGCTA, através do Prof. Wladimir Padilha da Silva participou de proposta vitoriosa no Edital CNPq/MAPA/DAS.

Afora isso, para temáticas nas quais outros grupos de pesquisa nacionais e internacionais já têm excelência, o PPGCTA tem buscado colaborações, sobretudo através da mobilidade dos estudantes de doutorado. Em 2005 três cooperações de doutorado-sanduíche de 12 meses foram iniciadas: uma na Espanha (Marcia Monks Jantzen), outra na França (Luciano Lucchetta) e a terceira no Canadá (Marcio Roggia Zanuzo). Em 2007-2008, o doutorando Lauri Maier realizou estágio sanduíche na Alemanha. No período 2008-2009, dois estudantes tiveram propostas aprovadas no programa PDEE/CAPEs: um esteve na Alemanha (Lírio Inácio Haas) e outro na Inglaterra (Elén Nalério) por 12 meses. Uma estudante no Programa Colégio Doutoral Franco Brasileiro (Renata Filgueiras) ainda está em Clermont Ferran - França, onde desenvolve tese em co-tutela e onde permanecerá por 18 meses. Dessa forma, o Programa tem estabelecido cooperações duradouras, cuja sequência deverá incluir a



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE AGRONOMIA “ELISEU MACIEL”  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL**

mobilidade bilateral, especialmente considerando-se a aprovação de Projeto no Edital CAPES/COFECUB pelo Prof. Cesar Valmor Rombaldi (2008-2012). Desde 2003, o PPGCTA tem recebido estudantes e técnicos da Universidade de Weistephan-Freising-Alemanha, instituição com a qual mantém convênio de intercâmbio em pós-colheita. Semelhantemente, o PPGCTA tem trazido professores de instituições internacionais para colaborar nos projetos de pesquisa e na formação acadêmica local (Rolf Röber - Alemanha; Clément Vigneault - Canadá; Jean-Claude Pech e Alain Latché - França; Cathie Martin - Inglaterra).

Com isso, busca o Programa a formação de mestres e doutores com sólida formação acadêmica e de pesquisa, com significativa contribuição inovadora para o setor de C&T de Alimentos regional e nacional. Por isso, o PPGCTA tem estimulado os estudantes a participar nas reuniões e seminários promovidos pelos APL, especialmente frutas e hortaliças, grãos e carnes.

Entretanto e apesar das recentes aquisições de equipamentos e de instrumentos e da cobertura técnica advinda de colaborações externas, de âmbito nacional ou internacional, a necessidade de ampliação do pessoal técnico é imperioso. Conta o PPGCTA com dez (10) professores permanentes e três (3) colaboradores, para um público de cerca de 80 estudantes. O aprofundamento dos estudos, com nivelamento com os centros de pesquisa em avançados graus de especialização e com destacada atuação no tema, que permita a manutenção e a ampliação de visibilidade, de espaços e de intercâmbios, dependem de um forte apoio, a se viabilizar através de financiamentos pelas agências de fomento - caso, por exemplo, dos Editais CNPq e CT-Infra (estrutura e manutenção) e do presente Edital PNPD, aportando reforços de pessoal de alta e recente qualificação. Desta forma, e através de ações dinâmicas e sólidas, os grupos de pesquisa incrementarão seu potencial de resultados na geração e produção de tecnologia de inovação, atendendo a sempre crescente demanda da sociedade. A atualização de laboratórios e a liderança ampliada pela presença de pós-doutorandos diretamente nos laboratórios, permitem incentivar de forma especial os alunos de melhor desempenho acadêmico e potencial para a pesquisa, com maior envolvimento e resultados na produção técnico-científica. Esta é uma das barreiras, que separa o PPGCTA do mundo que produz e publica seus trabalhos em periódicos científicos de reconhecido impacto internacional.

A produção intelectual nos últimos anos tem se mantido, com leve incremento em 2009, representando uma média de três (3) artigos por docente permanente do programa/ano. Verifica-se ainda, que a maioria desses artigos foram publicados em revistas bem classificadas no Qualis/CAPES, com algumas publicações em revistas internacionais; em uma delas, com impactação elevada, Postharvest Biology and Technology, três artigos (2005 e 2006). No entanto, quando esses resultados são comparados com as metas propostas pela CAPES ou mesmo com a média apresentada pelos principais programas da área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, eles mostram-se modestos. Estes fatos, aliás, foram insuficientes para a manutenção do Conceito 5 em 2006 (triênio 2004-2006), recebido na avaliação da CAPES no triênio 2001-2003.

O quadro docente e discente tem participado de eventos nacionais e internacionais, como o ICOMST, o International Ethylene Symposium and Postharvest Biology and Technology e os congressos do IFST, publicando trabalhos ou resumos completos (116), organizando (5) livros e elaborando outros capítulos de livros (5), organizando eventos (Cursos de Tecnologia de Embutidos Cárnicos, Curso de Atualização Tecnológica em Qualidade de Arroz na Indústria, Curso de Secagem e Armazenamento de Grãos, Cursos de Formação de Auditores na área de



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE AGRONOMIA “ELISEU MACIEL”  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL**

Armazenamento de Grãos), participando de palestras e mesas redondas, preparando projetos e relatórios de pesquisa e desenvolvimento, o que demonstra sua qualidade e atualização. Em 2005, retornou professor (Leonardo Nora) de doutoramento no John Innes Center - Inglaterra e foi integrado à equipe. Em 2008, o Professor Cesar Valmor Rombaldi cumpriu pós-doutoramento no ENSAT/Toulouse França e outras missões de estudo e pós-doutoramentos já estão previstas no Projeto CAPES/COFECUB.

Todos os docentes enquadrados como Professores Permanentes têm experiências de mais de cinco anos em orientações e projetos de pesquisas aprovados em editais das principais entidades de fomento (CNPq, FAPERGS, SCT do RS, FINEP-CT Infra e FAO). Destaca-se ainda que sete (7) dos dez (10) docentes do quadro permanente da UFPel são Bolsistas de Produtividade em Pesquisa do CNPq e que têm aprovado projetos de auxílio à pesquisa em Editais do CNPq, da FAPERGS e da Secretaria de C&T - Pólo de Alimentos. Portanto, ao colocar pelo menos um projeto aprovado em cada um dos laboratórios, propiciando maior envolvimento com a formação de profissionais altamente especializados, demonstra o Programa perfeitamente que sua meta pela melhoria das condições vem sendo buscada com afinco e dedicação.

Em se considerando projetos de inovação tecnológica, dois professores (Prof. Moacir Cardoso Elias e Prof<sup>a</sup>. Claire Tondo Vendrúsculo) têm patentes registradas ou em vias de registro no Brasil e no exterior.

Do ponto de vista da qualificação de egressos, merece destacada atenção o permanente e continuado sucesso alcançado pelos mesmos em concursos públicos para a docência (em Universidades, Centros e Institutos Federais e Estaduais de Ensino) e para a pesquisa (Embrapa e Órgãos Estaduais de Pesquisa), bem como, contratações por empresas privadas de porte da área de alimentos e agroindústrias.

Neste contexto, e considerando os objetivos na concepção do Edital, a inserção de jovens doutores, através da aprovação de projetos neste Edital PNPD, ao reforçar o quadro do PPGCTA, permitirá:

1. a ampliação e o aprofundamento de estudos em níveis capazes de propiciar produção científica qualificada em periódicos com impacto;
  - 2 a geração de processos/tecnologias potencialmente patenteáveis contribuindo, dessa forma, com a Política de Desenvolvimento Produtivo (PDP), à Lei nº 10.973/04 - Lei da Inovação e à Lei nº 11.487; que disciplina e concede incentivo fiscal ao desenvolvimento de projetos de P&D&I conjuntos de instituições de C&T e empresas;
  3. a qualificação ainda melhor de egressos em área estratégia para a Nação - a de C&T de Alimentos;
  4. com a atuação desses profissionais em disciplinas contribuir para a dinamicidade e incremento de atividades formação complementares; e
  5. a geração de base de conhecimento científico capaz de evoluir para apoios técnicos efetivos empresas de base tecnológica (EBT's).
- Importante também salientar a possibilidade de dois concursos públicos no



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE AGRONOMIA “ELISEU MACIEL”  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL**

DCTA/FAEM nas áreas dos subprojetos, tendo em vista as aposentadorias dos Professores Celso Medida Fagundes (do Grupo de Pesquisa em Microbiologia Agroindustrial) por tempo de serviço a efetivar-se em 2009/2010 e Pedro Luiz Antunes (Grupo de Pesquisa em Ciência e Tecnologia de Frutas e Hortaliças) compulsória 70 anos, prevista para 2010/2011. Seria oportunidade para a incorporação (vez lograrem aprovação no concurso) dos bolsistas à equipe do PPGCTA.



## Sub-projeto II

### DESENVOLVIMENTO DE IMS-PCR COM ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA *InlA* PARA DETECÇÃO DE *L. monocytogenes* EM ALIMENTOS

#### 1. INTRODUÇÃO: o problema, o mérito, a originalidade e a relevância da proposta.

As bactérias do gênero *Listeria* apresentam-se morfológicamente como cocos Gram-positivos, são anaeróbias facultativas, intracelulares facultativas e não formam esporos. Esse gênero é constituído por seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* e *L. gray* (Gasarov et al., 2005; Torres, et al., 2005), das quais apenas *L. monocytogenes* é patogênica ao homem (Bell & Kyriakides, 2005).

*L. monocytogenes* causa a listeriose, uma infecção que ocorre principalmente pelo consumo de alimentos contaminados com esse microrganismo, cujas complicações mais freqüentes ocorrem em nível de útero, sistema nervoso central, ou corrente circulatória. Em humanos imunocomprometidos, idosos e crianças, geralmente, manifesta-se em forma de septicemia ou meningite. Na gravidez pode culminar em aborto ou nascimento de um bebê gravemente doente (McLauchlin, 1996, Graves & Swaminathan, 2001). Embora seja uma doença com baixa incidência, quando comparada com outras de origem alimentar, a mortalidade é alta, podendo ficar ao redor de 30% (Gasarov et al., 2005). Dados do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), dos EUA, disponibilizados em 2000, indicam que de todos os patógenos investigados por aquele centro, *L. monocytogenes* apresentou a segunda maior taxa de mortalidade (21%), e a mais alta taxa de hospitalização (90,5%) (Anonymous, 2003).

*L. monocytogenes* é um microrganismo ubíquo que está amplamente distribuído no ambiente doméstico (Dugan & Philips, 1998), no ambiente de plantas de processamento de alimentos (Aguado et al, 2004; Laer et al., 2005; Lima et al., 2005) e em diversos alimentos (Silva et al., 2004; Hofer et al., 2006). Sua ubiqüidade, aliada à tolerância a altas concentrações de sal, acidez, atmosfera modificada, bem como sua capacidade de multiplicação sob temperaturas de refrigeração, torna difícil a obtenção de alimentos totalmente livres desse patógeno (Bell & Kyriakides, 2005). Mesmo assim, na Europa e nos Estados Unidos, é exigida a ausência (*Zero tolerance*) de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo (Anonimous, 2001,



2004). No Brasil, a legislação vigente (Brasil, 2001), exige a avaliação desse microrganismo apenas em queijos de média e de alta umidade e, da mesma forma que nos países europeus e nos EUA, para que esses alimentos estejam próprios para o consumo, é necessária a ausência da bactéria em 25g do produto.

Um outro aspecto a ser considerado, é que a não identificação de *L. monocytogenes* em um alimento, antes de sua comercialização, pode resultar no recolhimento (*Recall*) do produto no comércio. Ressalta-se que o prejuízo para uma indústria com um *recall* não se restringe apenas aos custos envolvidos com o recolhimento e destruição do produto, mas, sim, afeta sobremaneira a credibilidade da marca comercial e a relação de confiança estabelecida com o consumidor (Antoniolli, 2001).

Desde que foi reconhecido, em 1981 (Schlech et al., 1983), que a listeriose é uma doença de origem alimentar, houve um grande avanço nos métodos e nos meios de cultura utilizados para detectar *L. monocytogenes*. Embora existam técnicas rápidas para a detecção desse microrganismo em alimentos (baseadas principalmente, em PCR, hibridização do DNA ou em ensaios imunoenzimáticos), a grande maioria dos laboratórios utiliza os métodos tradicionais, baseados no uso de meios de pré-enriquecimento seletivo, enriquecimento, e crescimento em meios de cultura seletivo/diferenciais, para o isolamento de colônias viáveis, seguidos de testes bioquímicos para identificação em nível de espécie, como aqueles preconizados pela FDA/BAM, USDA e ISO 11290 (Hearty et al., (2006). Os métodos tradicionais são bastante sensíveis e permanecem como *Gold Standard*, entretanto, são laboriosos, apresentam custo operacional elevado, e são demorados, requerendo vários dias para se obter a diferenciação entre as espécies (Gasnov et al., 2005; Jantzen et al., 2006), além de não serem suficientemente sensíveis para detecção de baixa concentração celular proveniente de alimentos (Gray e Bhunia, 2005)

Em vista desses fatores, tem havido uma busca constante, particularmente pelas indústrias de alimentos, por métodos sensíveis, específicos e rápidos para a detecção desse patógeno, principalmente devido a necessidade de atendimento aos parâmetros estabelecidos pelos organismos reguladores governamentais e/ou pelo comércio internacional, bem como para liberação mais rápida de produtos perecíveis (Paoli et al., 2004; Gasnov et al., 2005)

Diversas estratégias têm sido utilizadas com esse objetivo, a maioria baseada na reação antígeno-anticorpo, como é o caso da separação imunomagnética (IMS), ou na amplificação do DNA através da Reação em Cadeia da Polimerase (Polimerase Chain Reaction, PCR) (Hudson, 2001). Esses métodos apresentam maior facilidade de execução e mais rapidez na obtenção





dos resultados, além de apresentarem boa sensibilidade e especificidade quando comparados aos métodos tradicionais de cultivo. Entretanto, ambos apresentam limitações que precisam ser suplantadas: no caso da IMS, as microesferas de poliestireno magnetizadas são importadas e caras e os anticorpos utilizados para sensibilizar essas microesferas necessitam ser específicos para *L. monocytogenes*; com relação a PCR, é de crucial importância a adequada seleção de genes alvo e a otimização das condições de reação.

As microesferas de poliestireno geralmente são sensibilizadas com anticorpos monoclonais (MAbs), os quais tem sido cada vez mais utilizados devido a sua especificidade. Os MAbs são imunoglobulinas secretadas por clones de células (hibridomas) que são obtidas através da fusão *in vitro* de linfócitos B produtores de anticorpos com células de mieloma (células de tumor de linfócitos B) (Kohler e Milstein, 1975; Harlow e Lane, 1988). Como os MAbs reagem com apenas um epítipo do antígeno, a principal dificuldade dessa técnica é obter MAbs com uma afinidade adequada para detectar pequenas quantidades do antígeno. O alvo para produção de MAbs, preferencialmente, deve ser uma proteína de membrana que apresente distribuição uniforme na superfície da célula do microrganismo alvo, e cuja localização facilite o acesso do anticorpo. Nesse perfil, enquadra-se a Internalina A (InIA) (Gasanov et al., 2005), que é uma proteína de membrana celular de grande expressão, estando covalentemente ancorada na parede celular da espécie *L. monocytogenes* (Cabanés et al. 2002).

Com relação à escolha de genes para serem utilizados como alvo na reação PCR, há necessidade de seleção daqueles que sejam capazes de discriminar a bactéria em nível de espécie, tendo em vista que, embora todas as espécies de *Listeria* apresentem características fenotípicas extremamente semelhantes, apenas *L. monocytogenes* é patogênica ao homem. Diversos genes têm sido utilizados, como *hly* (Schuerch et al., 2005), *actA* (Dussurget et al., 2004), *plcA*, *plcB*, e *inIA* (Jacquet et al. 2002, Jantzen et al., 2006). Desses, *inIA*, gene que codifica para a proteína internalina A (InIA), é um marcador adequado para esse microrganismo, tendo em vista que está sempre presente e é específico de *L. monocytogenes*, independentemente de origem, sorotipo e virulência da cepa (Glaser et al., 2001; Poyart et al., 2003), bem como é expresso em nível basal, havendo correlação direta entre sua expressão e capacidade de invasão do microrganismo na célula do hospedeiro (Dramsi et al., 1993).

Frente ao exposto, métodos rápidos, eficientes e mais baratos para a detecção de *L. monocytogenes* em alimentos, baseados na detecção do gene *inIA* e seu produto, podem ser desenvolvidos. Esses métodos vêm ao encontro das necessidades das indústrias de alimentos, que poderão fazer um *screening* mais rápido e seguro de seus produtos antes de colocá-los no



mercado, e dos órgãos governamentais que poderão utilizá-los como forma mais eficiente de garantir alimentos seguros ao consumidor.

## 1.1 HIPÓTESE

É viável desenvolver um método mais rápido, específico e sensível do que os convencionais para detecção de *Listeria monocytogenes* em alimentos, baseado em IMS-PCR com anticorpos monoclonais (MAbs) contra Internalina A (anti-InIA), usando-se microesferas sensibilizadas *in house*.

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.2. Gerais

- Desenvolver um método baseado em IMS-PCR com anticorpos monoclonais (MAbs) contra Internalina A (anti-InIA), usando-se microesferas sensibilizadas *in house*, para detectar *L. monocytogenes* em alimentos de modo mais rápido, específico e sensível do que os convencionais;

- Formar recursos humanos em nível de graduação e pós-graduação em microbiologia e biotecnologia de alimentos.

### 1.2.3. Específicos

- Clonar e expressar o gene *inIA* de *L. monocytogenes*
- Produzir MAbs específicos contra a proteína internalina A (InIA)
- Utilizar os MAbs na sensibilização das microesferas *in house*
- Padronizar as condições da IMS
- Padronizar um PCR para o gene *inIA*
- Comprovar o desempenho do IMS-PCR



#### 1.2.4. Metas e indicadores de produção científica, tecnológica e de formação de recursos humanos:

- IMS-PCR para detecção de *Listeria monocytogenes* em alimentos validado
- Estudantes de graduação, mestrado e doutorado treinados e formados pelo grupo de pesquisa com participação do bolsista de pós-doutorado.
- Teses, dissertações e trabalhos de conclusão de cursos de graduação produzidos com os resultados obtidos no projeto
- Artigos publicados em periódicos com alto impacto técnico-científico;
- Trabalhos apresentados em eventos científicos de importância na área;

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto será desenvolvido utilizando estrutura existente em três laboratórios da UFPel: Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel; Laboratório de Imunologia Aplicada, do Centro de Biotecnologia; e Laboratório de Biologia Molecular, também do Centro de Biotecnologia.

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Cepas bacterianas

Serão utilizadas cepas de *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. gray*, e de outras espécies bacterianas que possuam similaridade genética com a bactéria alvo.

#### 2.1.2. Microesferas magnetizadas

Serão utilizadas microesferas de poliestireno magnetizadas com 0,86µm, recobertas com proteína A, em suspensão com 1% de sólidos (10mg.mL<sup>-1</sup>) (Bangs Laboratories, Fishers, IN, USA)



### 2.1.3. Modelos biológicos

Serão utilizados camundongos da linhagem BALB/c com 6 a 8 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério da UFPel.

### 2.1.4. Materiais para microbiologia e biotecnologia (Meios de cultura, *primers*, dNTPs, Taq DNA polimerase, etc.)

Serão adquiridos em empresas especializadas.

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Descrição dos experimentos

O trabalho constará de quatro experimentos em série, como segue:

A) Otimizar a IMS com MAbs anti-InIA produzidos *in house*, que se realizará em três etapas em série:

a.1) avaliar a especificidade dos MAbs produzidos;  
a.2) sensibilizar as microesferas com o MAb de melhor desempenho no experimento anterior

a.3) padronizar a IMS

B) Calibrar a PCR com sequência do gene *inIA* como molde

C) Comprovar o desempenho do IMS-PCR proposto em culturas puras de *L. monocytogenes*

D) Comprovar o desempenho do IMS-PCR proposto em alimentos artificialmente contaminados e naturalmente contaminados



## 2.2.2. Preparo do material para os experimentos

### 2.2.2.1. Amplificação do gene *inlA* e obtenção da rInlA

A sequência do gene *inlA* será obtida do GenBank e usada como molde para o desenho dos *primers*, visando a clonagem direcional de um fragmento do gene em plasmídeo, e para gerar, internamente aos sítios de restrição, um códon de iniciação ATG e um de terminação TAA nas extremidades 5' e 3' do gene, respectivamente. A sequência será amplificada por PCR a partir do DNA cromossomal de *L. monocytogenes*, o qual será extraído utilizando-se o kit PureGene (Gentra Systems). O produto de cada reação será analisado em gel de agarose, contendo brometo de etídeo. Após, será clonado no vetor pAE, entre os sítios de restrição *Bam*HI e *Kpn*II, e introduzido, por eletroporação, em cepas de *E. coli* TOP 10F. Os clones recombinantes serão selecionados e o DNA plasmidial extraído utilizando o kit GFX Microplasmid prep (GE Healthcare). Após, os plasmídeos recombinantes serão introduzidos na cepa de *E. coli* pLysS visando a expressão da proteína InlA recombinante (rInlA). Os clones recombinantes serão cultivados em caldo LB sob agitação (37°C - 250rpm<sup>-1</sup>), até a fase log de crescimento, e terão a expressão da proteína recombinante posteriormente induzida com 0,2 mM de IPTG.

#### 2.2.2.2. Produção dos anticorpos monoclonais

A obtenção dos anticorpos monoclonais será feita de acordo com protocolo estabelecido por Harlow & Lane (1988). Camundongos da linhagem BALB/c com idade de seis a oito semanas, serão imunizados com a rInlA. No primeiro dia, será injetado intraperitonealmente (i.p) uma emulsão do imunógeno (100µg) em adjuvante de Freund completo. Nos dias 14 e 21 serão feitas doses de reforço com a mesma quantidade de antígeno em adjuvante de Freund incompleto. Ao fim da quarta semana, será retirado sangue através do plexo venoso retro-orbital para realização da titulação de anticorpos por um ELISA indireto com a proteína rInlA. Os dois camundongos com título mais alto de anticorpos receberão nova dose de antígeno endovenosa (e.v) e i.p e, após três a quatro dias, serão sacrificados para obtenção dos esplenócitos para realizar a fusão com as células de mieloma em presença de Polietileno glicol (PEG) 50%. As células serão cultivadas em DMEM-HAT com alta concentração de glicose e as cavidades com



crescimento serão testadas num ELISA indireto. Os hibridomas secretores de MAbs anti-rInIA serão clonados duas vezes pela técnica da diluição limitante, re-testados, expandidos e armazenados sob congelamento em nitrogênio líquido, ou injetados em camundongos para produção de ascite.

#### **2.2.2.3. Purificação e classificação dos anticorpos monoclonais**

Os anticorpos serão purificados a partir do fluido ascítico por precipitação com sulfato de amônia e cromatografia de afinidade com proteína A (IgG) ou gel filtração (IgM) (Harlow & Lane, 1988). A classe e subclasse dos anticorpos monoclonais será determinada com soros anti-classe e sub-classe específicos através de um teste ELISA disponível comercialmente (Sigma).

#### **2.2.2.4. Especificidade dos anticorpos**

A comprovação da reação específica dos MAbs com *L. monocytogenes* será realizada através de ensaios ELISA indireto e Western blot (Harlow & Lane, 1988). Serão utilizados como antígenos, cultivos de *L. monocytogenes*, demais espécies de *Listeria*, e outras espécies bacterianas que possuam similaridade genética com a bactéria alvo. Cepas pertencentes a todos os sorotipos de *L. monocytogenes* serão incluídas no painel de antígenos.

#### **2.2.2.5. Sensibilização das microesferas de poliestireno e padronização do protocolo de IMS**

O MAb com melhor desempenho no experimento A.a.1. será utilizado para sensibilizar as microesferas de poliestireno magnetizadas. Para a sensibilização, serão determinadas as concentrações de microesferas e de MAbs a serem utilizadas, de acordo com protocolo descrito por Conceição (2004). Após, será estabelecido protocolo para utilização da IMS na etapa de enriquecimento seletivo (em Caldo Fraser), o qual será artificialmente inoculado com cultivos puros de *L. monocytogenes* (cepa Scott-A). Para a separação das microesferas do caldo de enriquecimento, será utilizado um separador magnético de partículas (MPC-S, Dynal, Oslo, Norway) e, após a separação, estas serão lavadas três vezes com Salina Tamponada Fosfatada (PBS, pH 7,4) estéril, ressuspensas em PBS e semeadas em ágar seletivos para *Listeria* (Oxford e Palcam), para isolamento e caracterização das colônias. A avaliação da sensibilidade do protocolo será realizada tendo-se como controle o método convencional de cultivo.



#### 2.2.2.6. Avaliação da especificidade do *primer* para detecção de *L. monocytogenes* por PCR

A sequência do gene *inlA*, obtida do GenBank, será usada como molde para o desenho dos *primers*. As condições da PCR, como temperaturas de anelamento e concentração ideal de *primers* e  $MgCl_2$ , serão otimizadas, e os produtos serão visualizados através de eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio. A especificidade da PCR será determinada utilizando-se DNA extraído de *L. monocytogenes* como controle positivo, e das demais espécies de *Listeria*, e de outras espécies bacterianas que possuam similaridade genética com a bactéria alvo, como controle negativo.

#### 2.2.2.7. Preparação do inóculo de *Listeria monocytogenes* para avaliação da sensibilidade do IMS-PCR

Uma cepa de *L. monocytogenes* Scott A será inoculada em TSB com extrato de levedura 0,6% (TSB-YB), e incubada a 37°C por 24h. A partir desse crescimento, serão preparados inóculos em TSB-YB, com concentrações finais de zero,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup>, as quais serão confirmadas por contagem em placas, utilizando-se ágar para Contagem em Placas (PCA). Esses inóculos serão utilizados para avaliação da sensibilidade para detecção de *L. monocytogenes* pelo IMS-PCR proposto e pelo método convencional de cultivo

### 2.2.3. Avaliações

#### 2.2.3.1. Especificidade dos MAbs por ELISA indireto e Western blot, conforme protocolo proposto por Harlow & Lane, 1988.

2.2.3.1.1. Quantidade de IgG (MAb) adsorvida às microesferas, por espectrofotometria, conforme protocolo proposto por Conceição, 2004.

2.2.3.1.2. Método convencional de cultivo: Será realizado conforme protocolo de Farber et al., 1994)

2.2.3.1.3. Especificidade do *primer* por PCR calibrado no laboratório.

2.2.3.1.4. Sensibilidade para detecção de *Listeria monocytogenes* em meio de cultura, pelo IMS-PCR proposto, tendo-se o método convencional como controle.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE AGRONOMIA “ELISEU MACIEL”  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL

2.2.3.1.5. Sensibilidade para detecção de *Listeria monocytogenes* em alimentos, pelo IMS-PCR proposto, tendo-se o método convencional como controle.





### 3. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

| Atividades / Semestres                                 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| Atualização bibliográfica                              | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X  |
| Reuniões de pesquisa                                   | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X  |
| Formação de recursos humanos                           | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X  |
| Experimento A  | X | X | X | X |   |   |   |   |   |    |
| Experimento B  |   |   |   | X | X |   |   |   |   |    |
| Experimento C  |   |   |   |   |   | X | X | X |   |    |
| Experimento D  |   |   |   |   |   |   |   |   | X | X  |
| Análise dos resultados                                 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X  |
| Apresentação em Congressos e similares                 |   | X |   | X |   | X |   | X |   | X  |
| Publicação de resultados em periódicos de alto impacto |   |   |   | X |   |   |   | X |   | X  |



#### 4. EXPERIÊNCIA PRÉVIA DO CORDENADOR NA ÁREA DO PROJETO DE PESQUISA

O Grupo de Pesquisa em Microbiologia Agroindustrial vem pesquisando *L. monocytogenes* na região sul do Rio Grande do Sul desde 1999, e dentro dessa temática já foram defendidas 2 teses de doutorado, 6 dissertações e, atualmente, estão em andamento 3 dissertações e 4 teses.

Experimentos têm sido conduzidos no sentido de esclarecer a prevalência do microrganismo em alimentos comercializados na região (Silva et al., 2002; Antoniollo et al., 2003; Silva et al., 2004; Nero et al., 2004) bem como estudar sua disseminação na cadeia produtiva de diferentes alimentos (Silva et al., 2004; Lima et al., 2005; Silva et al., 2006; von Laer et al., 2009; Nalério et al., 2009), utilizando-se distintas técnicas moleculares (RAPD, PFGE, Seqüenciamento parcial do gene *actA*). Esses estudos, além de terem sido publicados em periódicos científicos importantes, geraram conhecimento sobre o patógeno na região avaliada, e os resultados têm sido repassados para as indústrias de alimentos, bem como para os órgãos de vigilância, servindo como suporte para a adoção de estratégias de controle visando a produção de alimentos seguros. Atualmente, as pesquisas estão sendo direcionadas para o melhor entendimento dos mecanismos de virulência das cepas de *L. monocytogenes* prevalentes na região, bem como para o desenvolvimento de métodos mais rápidos, sensíveis e específicos para a detecção desse patógeno.

Com relação à formação de recursos humanos, desde o ingresso como docente da UFPel, em 1989, tem atuado no ensino e na orientação de alunos de graduação e de pós-graduação. Na administração, já participou em Conselhos Superiores (COCEPE), Direção de Pesquisa da UFPel, e Coordenação de PPG (Ciência e Tecnologia Agroindustrial). Na atualidade, atua em tempo integral, com dedicação exclusiva, ao ensino (graduação e pós-graduação), pesquisa e desenvolvimento (3 projetos temáticos em andamento, 13 orientações em andamento)

#### 5. COERÊNCIA E ADEQUAÇÃO ENTRE A CAPACITAÇÃO E A EXPERIÊNCIA DA EQUIPE AOS OBJETIVOS, ATIVIDADES E METAS.

Para demonstrar a adequação entre a capacitação e a experiência da equipe aos objetivos, atividades e metas propostas, serão descritos os dados institucionais, a infra-estrutura e a qualificação da equipe na temática proposta.



### 5.1. Dados Institucionais

Denominação: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Campus Universitário, CxP 354, CEP 96010.900, Pelotas-RS

Fone/Fax: (53) 3275-7258, R. 203

Unidade Executora: Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA), da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM)

### 5.2. Equipe: coordenação, pesquisadores, estudantes, qualificação e envolvimento com a proposta neste subprojeto

- WLADIMIR PADILHA DA SILVA (Coordenador do sub-projeto), Doutor, Responsável pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCTA, FAEM, UFPel, Bolsista PQ nível 2 do CNPq

- JOSÉ ANTÔNIO GUIMARÃES ALEIXO, Doutor, Responsável pelo Laboratório de Imunologia Aplicada, do Centro de Biotecnologia (CENBIOT) da UFPel, Bolsista PQ nível 2 do CNPq, com ampla experiência em ensaios imunoenzimáticos.

- FABRÍCIO ROCHEDO CONCEIÇÃO, Doutor, docente e pesquisador da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), com experiência em biotecnologia e imunologia. Bolsista PQ nível 2 do CNPq

- MARCELO MENDONÇA, Médico Veterinário, doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFPel, cuja dissertação testou a hipótese do uso de anticorpos policlonais anti-InIA para detecção de *Listeria monocytogenes*.

- Demais doutorandos, mestrandos e bolsistas IC,; a serem selecionados

### 5.3. Estrutura e potencialidade da equipe e unidade executora

A presente proposta será desenvolvida em três laboratórios com estrutura adequada para dar suporte ao estudo e envolve, como líderes, três pesquisadores com experiência técnico-científica e na formação de recursos humanos, todos com Bolsa PQ do CNPq. Além



desses, haverá a inserção de estudantes de graduação, mestrado e doutorado, buscando uma constante e sólida formação em pesquisa e desenvolvimento.

#### 5.4. Coerência entre a qualificação da equipe e a proposta temática

A proposta apresenta caráter inovador e, para atingir os objetivos e as metas propostas, há necessidade de uma equipe multidisciplinar, com conhecimento baseado em microbiologia (Wladimir Padilha da Silva), imunologia (José Antônio Aleixo) e biotecnologia (Fabrício Rochedo Conceição). Desse modo, o projeto foi estruturado considerando-se: 1) os recentes avanços nessas áreas; 2) os investimentos na infra-estrutura local; 3) possibilidades de cooperação com outros GPs da UFPel e fora da UFPel; 4) formação dos profissionais do quadro permanente da UFPel; e 5) formação dos estudantes de graduação e pós-graduação.

#### 6. ASPECTOS ÉTICOS

Os animais utilizados neste projeto serão tratados de acordo com as normas internacionais e em consonância com os princípios éticos de experimentação animal do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da UFPel (protocolo 017/2007).

#### 7. ORÇAMENTO PARA FINANCIAMENTO NESSA PROPOSTA:

|  |               |
|--|---------------|
| Material de consumo: Reagentes para laboratório, enzimas, dNTPs, meios de cultura, placas, tubos, ponteiros para pipetadores e outros itens descartáveis, material de publicação, kits para extração e purificação de macromoléculas | R\$ 48.000,00 |
|--|---------------|

|  |               |
|--|---------------|
| Serviços de terceiros: Manutenção e conserto de equipamentos | R\$ 12.000,00 |
|--|---------------|

|                         |               |
|-------------------------|---------------|
| Total nesse Subprojeto: | R\$ 60.000,00 |
|-------------------------|---------------|

Os animais utilizados neste projeto serão tratados de acordo com as normas internacionais e em consonância com os princípios éticos de experimentação animal do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da UFPel (protocolo 017/2007).



## 8. ORÇAMENTO PARCIAL, EM EXECUÇÃO, DO PROJETO CUSTEADO POR OUTRAS PROPOSTAS:

Edital MCT/CNPq 15/2007 Faixa B

|                                     |  | VALOR<br>UNITÁRIO<br>(R\$) | VALOR<br>TOTAL<br>(R\$) |
|-------------------------------------|--|----------------------------|-------------------------|
| MATERIAL DE<br>CONSUMO<br>(CUSTEIO) | Meios de cultura, suplementos seletivos, etc.  |                            | 4.000,00                |
|                                     | TaqPolimerase, <i>primers</i> , DNA <i>ladder</i> , DNTP, etc.                         |                            | 5.000,00                |
|                                     | Placas descartáveis, placas de cultivo, placas de ELISA.                               |                            | 3.000,00                |
|                                     | Meios para preparação dos hibridomas, Kit de isotipagem, conjugado, microesferas, etc. |                            | 6.000,00                |
|                                     | <b>Sub-Total</b>   |                            | <b>18.000,00</b>        |
| MATERIAL<br>PERMANENTE              | Liofilizador de bancada com vacuômetro, aquecimento da plataforma e fechamento a vácuo | 21.000,00                  | 21.000,00               |
|                                     | <b>Sub-Total</b>   |                            | <b>21.000,00</b>        |
|                                     | <b>Total</b>   |                            | <b>39.000,00</b>        |

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguado, V.; Vitas, A.I.; García-Jalón, I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. **International Journal of Food Microbiology**, 90 p.341- 347, 2004.

Anonymous. **Guidelines for the interpretation of results of microbiological analysis of some ready-to-eat foods sampled at point of sale**. Food Safety Authority of Ireland, Abbey Court, Lower Abbey Street, Dublin 1, Ireland. 2001.

Anonymous. Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. FDA/Centre for Food Safety and Applied Nutrition, USDA/Food Safety and Inspection Service, Centres for Disease Control and Prevention, USA, **Executive summary**, vii-xv, 2003.

Anonymous. Draft guidelines on the application of general principles of food hygiene to the management of *L. monocytogenes* in foods. European Community position paper-preparation for Codex Committee on Food Hygiene. **Agenda Item 7**: Washington, USA, 29<sup>th</sup> March-3<sup>rd</sup> April. 2004.



Antoniollo, P.C. *Listeria* spp. em ovinos e carcaças ovinas em nível de abatedouro. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, 2001.

Bell, C., Kyriakides, A. *Listeria. A practical approach the organism and its control in foods*. London, UK, Blakwell Publishing, 288p., 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Brasil nº 7-E, p. 46-53 Jan. 2001, seção.

Cabanes, D.; Dehoux, P.; Dussurget, O.; Frangeul, L.; Cossart, P. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 5, 2002.

Conceição, R.C.S. Detecção de *Salmonella* em produtos de frango usando a separação imunomagnética. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial/ UFPel, 2004

Duffy G.; Cloak, O.M.; Sheridan, J.J.; Blair I.S.; McDowell, D.A. The development of a combined surface adhesion and polymerase chain reaction technique in the rapid detection of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, 49, 151-159, 1999.

Dramsi, S., Kocks, C., Forestier, C., Cossart, P., Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature, and the pleiotropic activator prfA. **Molecular Microbiology**, 9 (5), 931-941. 1993.

Dussurget, O.; Pizarro-Cerda, J.; Cossart, P. Molecular determinants of *listeria monocytogenes* virulence. **Annual Review Microbiology**, 58:587-610, 2004.

Duggan, J., Philips, C.A. *Listeria* in the domestic environment. **Nutrition Food Science**, v 2, p73-79, 1998.

Farber, J.M.; Warburton, D.W.; Babiuk, T. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. **Government of Canada - HPB Method**, Quebec (Canada): Polyscience Publications, Sep. 1994.

Gasnov, U.; Hughes, D.; Hansbro, P. M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, 29 (5): 851-875, 2005.

Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., et al. Comparative genomics of *Listeria* species. **Science**, 294: 849-852. 2001.

Goding, J.W. **Monoclonal Antibodies: Principles and Practice**. Academic Press Limited, 315p, 1986.

Graves, L.M.; Swaminathan, B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. **Intern. Jour. of Food Micro.**, 65, 55-62. 2001.



Gray, K.M.; Bhunia, A.K. Specific detection of cytopathogenic *Listeria monocytogenes* using a two-step method of immunoseparation and cytotoxicity analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 60, 259- 268, 2005.

Harlow, E.; Lane, D. **Antibodies: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 726 p., 1988.

Hearty, S.; Leonard, P.; Quinn, J.; O`Kennedy, R. Production, characterisation and potential application of a novel monoclonal antibody for rapid identification of virulent *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiology Methods*, 66 (2): 294-312, aug, 2006.

Hofer, E.; Reis C.M. F.; Hofer C. B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39(1):32-37, jan-fev, 2006.

Hudson J.A.; Lake, R.J; Savill, M.G.; Scholes, P.; McCormick, R.E. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples using immunomagnetic separation followed by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 614-621, 2001.

Kohler, G.; Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256 (5517): 495-497, 1975.

Jacquet, C.; Gouin, E.; Jeannel, D.; Cossart, P.; Rocourt, J. Expression of ActA, Ami, InlB, and Listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of Human and Food Origin. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 2, p. 616 - 622, 2002.

Jantzen, M.M.; Navas, M.J.; Paz, M.; Rodriguez, B M.; SILVA, W. P; Nuñez, M.; Martínez-Suárez, J. Evaluation of ALOA plating medium for its suitability to recover high pressure-injured *Listeria monocytogenes* from ground chicken meat. *Letters in Applied Microbiology*, v. 43, p. 313-317, 2006.

Janzten, M. M.; Navas, J.; Corujo, A.; Moreno, R.; López, V.; Martínez-SuárezJ. V. Review. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PC. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4(3), 235-247, 2006.

Lima, A.S.; Laer, A.E.V ; Trindade, P.S.; SILVA, W. P. Disseminação de *L. monocytogenes* no processamento de lingüiça mista frescal avaliada por sorologia e RAPD. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara - SP, v. 16, n. 3, p. 245-251, 2005.

Marsh, E.J., Luo, H., Wang, H. A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities. *FEMS Microbiology Letters*, p. 1 - 8, 2003.

Mclauchlin, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control*, v.7, n 4/5, p. 187-193, 1996.



Nalério, É. S.; Araújo, M. R.; Mendonça, K. S.; Bassani, M.; SILVA, W. P. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul

Revista da SBCTA. (in press), 2009.

Poyart, C., Trieu-Cuot, P.; Berche, P. The *inlA* gene required for cell invasion is conserved and specific to *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*, 142, 173-180. 2003.

Paoli, G.C.; Chen, C.Y.; Brewster, J. D. Single-chain Fv antibody with specificity for *Listeria monocytogenes*. *Journal of Immunology Methods*, 289, 147- 155, 2004.

Torres, K.; Sierra, S.; Poutou, R.; Carrascal, A.; Mercado, M. Patogenesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonotico emergente. *MVZ-Córdoba*, 10:(1), 511-543, 2005.

Uyttendaele, M.; Hoorde V. I.; Debevere, J. The use of immuno-magnetic separation (IMS) as a tool in a sample preparation method for direct detection of *L. monocytogenes* in cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 54, 205-212, 2000.

SILVA, W. P.; Techera, S. B. C.; Jantzen, M.M.; Laer, A.N.V.; Lima, A.S.; Mata, M.M. *Listeria monocytogenes* en quesos tipo Minas producidos artesanalmente y comercializados en Pelotas, RS, Brasil. *Alimentaria*, Madrid, n. 359, p. 57-60, 2004.

Schuerch, D. W.; Wilson-Kubalek, E. M.; Tweten, R.K. Molecular basis of listeriolysin O pH dependence. *PNAS*, v. 102, n. 35, p. 12537-12542, 2005.

Schlech, W.F.; Lavigne, P.M.; Bortolussi, R.A.; Allen, A.C.; Haldane, E.V.; Wort, A.J; Hightower, A.W.; Johnson, S.E.; King, S.H.; Nicholls, E.S. Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food. *The New England Journal of Medicine*, v.308, n.4, p203-206, 1983.

Schubert W.D.; Urbanke, C.; Ziehm T.; et al. Heinz D.W. Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with Its Human Receptor E-Cadherin. *Cell*, Vol. 111, 825-836, Dec., 13, 2002.

von Laer, A.E.; Lima, A.S.; Trindade, P.S.; SILVA, W.P. Monitoramento de *Listeria monocytogenes* em planta de processamento de lingüiça mista frescal localizada em Pelotas, RS. *Revista Brasileira de Vigilância Sanitária*, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 192-198, 2005.

von Laer; A. E.; Lima, A. S.; Trindade, P. S.; Andriguetto, C.; Destro, M. T.; SILVA, W. P. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a fresh sausage processing line by PFGE. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40 (in press), 2009.