**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Perfil genotípico de cepas de *Listeria monocytogenes*
isoladas de alimentos: Análise crítica das técnicas de
PCR e PFGE e importância para a Saúde Pública**

Gillian Alonso Arruda

Tese apresentada à Faculdade de Saúde Pública
da Universidade de São Paulo para fins de
obtenção de título de Doutor em Saúde Pública,
na área de Serviços de Saúde do Departamento
de Prática de Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manuel Leal
Germano

Co-orientador: Prof. Dr. Maria Helena Matté

**São Paulo
2006**

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores.

Assinatura:

Data: 04 de abril de 2006.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a amizade e a importante colaboração dos profissionais:

Laboratório de Saúde Pública da Universidade de São Paulo

Ronalda Silva de Araújo

Milena Dropa

Miriam Lopes da Silva

Laboratório do Instituto Adolpho Lutz

Mônica Cândida Georgete Scola

Laboratório SFDK

Mário Killner

Agradeço ao meu amado esposo pelo apoio e incentivo

William Ma

Agradeço à minha mãe pelo exemplo de persistência e dedicação aos estudos

Norma Alonso Arruda

À Deus pela razão de viver

RESUMO

Arruda GA. Perfil genotípico de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de alimentos: Análise crítica das técnicas de PCR e PFGE e importância para a Saúde Pública. São Paulo; 2006 [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP]

Devido à gravidade da manifestação clínica e pelas altas taxas de mortalidade em populações de risco, o controle e a prevenção da listeriose, doença causada pela *L. monocytogenes*, representa um importante desafio às autoridades sanitárias. A dificuldade de recuperar organismos envolvidos nos surtos, a sub-notificação e a demora na realização de análises convencionais são alguns dos fatores que retardam ou impedem intervenções em situações de surto. Com o advento da biologia molecular, novas técnicas têm sido empregadas para a identificação e tipificação da *L. monocytogenes*, com o intuito de contribuir com os estudos epidemiológicos e de vigilância sanitária de alimentos. O presente estudo visou confirmar a taxonomia e o perfil genotípico de 31 cepas isoladas de diversos tipos de carne, supostamente identificadas como *L. monocytogenes*, por intermédio das técnicas de Reação de Cadeia pela Polimerase (PCR), com o emprego de iniciadores de identificação dos genes 16S rRNA e Internalina A e B, para confirmação da espécie. Os resultados indicaram que apenas 20 (65%) das cepas foram confirmadas como sendo da espécie investigada. Foi realizada ainda a avaliação de similaridade nas 20 cepas confirmadas, através da Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE), que revelou grande diversidade

genotípica, caracterizada por 18 diferentes perfis, segundo o coeficiente de similaridade de Pearson. Os resultados demonstraram que as técnicas moleculares são de grande utilidade para a identificação e tipificação de *L. monocytogenes*, caracterizando-se como importantes ferramentas epidemiológicas.

Descritores: *Listeria monocytogenes*, PCR, 16S, Internalina, PFGE, Vigilância.

ABSTRACT

Due to the seriousness of clinical manifestations and high rates of mortality of the listeriosis disease in populations at risk, control and prevention of this disease, caused by *L. monocytogenes*, represent an important challenge to sanitation authorities. Difficulties of recovering organisms involved in outbreaks; sub notification; and, the delay in accomplishing conventional analysis are some of the factors that slow-down or even prevent health interventions in outbreak occurrences. With the advent of the molecular biology, new techniques have been employed for identifying and typifying the *L. monocytogenes* aiming at contributing to studies on epidemiology and sanitary surveillance of foods. The present study aimed at ratifying the taxonomy and the genotypic profile of 31 isolated stocks of varied types of meats supposedly identified as *L. monocytogenes* by means of the Polymerase Chain Reaction (PCR) employing identification starters of genes 16 rRNA and A and B Internalin in order to confirm the species. Results indicated that only 20 (65.0%) of the stocks were confirmed as being from the investigated species. Another evaluation of similarity were also carried out along with the 20 stocks ratified through pulsed field gel electrophoresis (PFGE), which disclosed a great genotypic diversity characterized by 18 different profiles, according to the Pearson's similarity coefficient. Results demonstrated that the molecular techniques are very helpful for identifying and typifying the *L. monocytogenes*, characterizing themselves as important epidemiological tools.

Descriptors: *Listeria monocytogenes*, PCR, 16S, Internalin, PFGE,
Sanitary Surveillance.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Importância na Saúde Pública	2
1.2 Epidemiologia.....	3
1.3 Quadro Clínico	7
1.3.1 Septicemia	7
1.3.2 Infecção do Sistema Nervoso Central	7
1.3.3 Endocardite	8
1.3.4 Gastroenterite.....	8
1.3.5 Infecção Localizada.....	8
1.3.6 Infecção na Gestação	9
1.4 Características	11
1.4.1 Taxonomia	11
1.4.2 Ação Intracelular	14
1.4.3 Fontes	16
1.4.4 Formas de Transmissão.....	18
1.4.5 Análise de Risco.....	21
1.5 Fatores de Virulência e Patogenia	23
1.6 Caracterização Fenotípica e Genotípica	24
1.6.1 Métodos Fenotípicos	24
1.6.2 Métodos Genotípicos	27
1.7 Aplicação dos Métodos Moleculares para o Estudo da Espécie <i>L. monocytogenes</i>	29
1.7.1 Eletroferese em Campo Pulsado (PFGE).....	29
1.7.2 Reação em Cadeia Polimerase (PCR)	33
1.7.2.1 RAPD	37
1.7.2.2 Amplificação de Grupos Repetitivos.....	41
2. Objetivos	43
2.1 Objetivo Geral.....	43
2.2 Objetivos Específicos	43
3. Material e Métodos.....	44
3.1 Obtenção das Cepas	44
3.2 Confirmação de <i>Listeria monocytogenes</i> utilizando PCR	46

3.2.1 Extração do DNA genômico.....	46
3.2.2 Confirmação da Espécie por PCR	47
3.2.3 PCR para Confirmação da Presença do Gene Internalina AB.....	49
3.2.4 Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE).....	51
4. Resultados	55
4.1 Extração do DNA.....	55
4.2 Confirmação da espécie por PCR	55
4.2.1 Confirmação da Taxonomia pela Presença dos Genes 16S rRNA e Internalina	55
4.3 PFGE.....	60
4.3.1 Análise da Similaridade das Cepas de Alimentos Estudados.....	60
4.3.2 Análise de Similaridade das Cepas Controle.....	62
4.3.3 Análise de Similaridade do Total de Cepas Estudadas e Controle	63
5. Discussão	67
5.1 Confirmação da Espécie por PCR.....	67
5.1.1 Resultados Moleculares não Confirmaram a Identificação da Análise Microbiológica Convencional	67
5.1.2 Discussão dos Resultados do PCR para Identificação do Gene 16S rRNA.....	69
5.1.3 Discussão dos Resultados por PCR para identificação dos Genes Internalina A e B.....	70
5.2 Discussão sobre os Resultados da Diversidade pelo PFGE	72
5.2.1 Discussão da Análise de Similaridade das cepas de Alimentos Estudadas	73
5.2.2 Análise de Similaridade das Cepas Controle.....	77
5.2.3 Análise de Similaridade do Total de Cepas Estudadas e Controle	79
6. Conclusão	82
7. Considerações Finais.....	85
8. Referências	91

ANEXOS

1 – INTRODUÇÃO

Apesar dos progressos da ciência, tecnologia de produção de produtos alimentícios, as enfermidades causadas por patógenos de origem alimentar continuam representando problemas significativos para a saúde pública e para a economia mundial (Laciar e col. 1999).

De acordo com registros da Organização Mundial da Saúde (OMS), são detectados, anualmente, nos países em desenvolvimento, mais de um bilhão de casos de diarreia aguda em crianças menores de cinco anos, dos quais 5 milhões são fatais. A contaminação bacteriana dos alimentos é uma das causas primordiais destes casos. Estima-se que apenas de 1 a 10% dos casos sejam computados nas estatísticas oficiais. (Pellicer e col. 2002)

Segundo Jorge e col. 2001 foram internados nos hospitais do Sistema Único de Saúde (SUS) ou com ele conveniados, 908.900 casos de doenças infecciosas ou parasitárias, representando 7,6% do total de hospitalizados.

Os produtos de origem animal estão intimamente ligados à ocorrência de toxinfecções, constituindo riscos importantes em saúde pública. Produtos de origem animal como carne, ovos, leite, contaminados na origem que tenham sofrido contaminação durante sua elaboração, contribuem decisivamente para a incidência de infecções, geralmente de natureza diarreica. (Jorge e col. 2001; Germano & Germano 2001; Rocourt e col. 2003).

Ente as doenças veiculadas pelos alimentos, destaca-se a listeriose, causada pela bactéria *Listeria monocytogenes*, a mais patogênica para o homem, devido à gravidade da manifestação clínica e pelas altas taxas de mortalidade em torno de 20 a 30%, em populações de risco. A prevenção da ocorrência de listeriose representa um grande desafio para as autoridades sanitárias de todos os países, especialmente mais industrializados, onde a prevalência é maior. (Hof 2003a; Doganay 2003; Peters e col. 2003; Somer & Kashi 2003; Jung e col. 2003; Rocourt e col. 2003; Vasquez-Boland e col. 2001).

1.1 - IMPORTÂNCIA NA SAÚDE PÚBLICA

O gênero *Listeria* representa importante papel nas pesquisas de diferentes especialidades clínicas, tais como:

a) na área médica, provoca graves infecções em seres humanos e animais, de difícil diagnóstico e tratamento; (Hof 2003b; Abram e col. 2003; Alpas & Bozoglu 2003; Vasquez-Boland e col. 2001);

b) na biologia celular, é um parasita intracelular facultativo, que promove intensa comunicação e interações com a célula hospedeira (Peters e col. 2003; Kamm e col. 2003; Buchrieser e col. 2003);

c) na imunologia, modelos de mediador de imunidade celular foram baseados no estudo da listeriose (Peters e col. 2003, Kamm e col. 2003; Koub-

Maures 2003) e, complementarmente por ser fator do interesse do presente estudo:

d) na microbiologia dos alimentos, por ser um patógeno encontrado em vários alimentos, causador de severos quadros clínicos, provocados a partir de baixa dose infectante (Germano & Germano 2001; Hof 2003aa; Byun e col. 2001; Doganay 2003).

1.2 - EPIDEMIOLOGIA

A listeriose é doença de notificação compulsória e, apesar de poucos registros oficiais de sua ocorrência, representa grande preocupação para as autoridades de saúde pública, uma vez que apresenta alta taxa de mortalidade e atinge preferencialmente gestantes, idosos e indivíduos imunocomprometidos (Allerberger 2002; Doganay 2003; Jeffers e col. 2001; Doumith e col. 2004; Gasanov e col. 2005).

Nos Estados Unidos da América são confirmados 7,4 casos por milhão de habitantes/ano de listeriose invasiva, 16 casos de listeriose perinatal a cada 100 mil nascimentos, sendo 23% destes resultando em morte fetal, representando 2% das mortes fetais em geral. No Chile, a incidência entre os anos de 1982 a 1987 foi de 0,42 por mil nascidos vivos, com uma letalidade de 17,6% (Cisternas e cols, 2002).

Estudo de prevalência de *L. monocytogenes*, realizado na Áustria, a partir de amostras de fezes de pessoas, aparentemente, saudáveis, revelou uma taxa de apenas 0,8% de presença do patógeno (Grif e col. 2001).

A exposição ao patógeno, obviamente, é grande, face ao caráter ubiquitário do agente, no entanto, cerca de 90% dos adultos possuem resistência imunológica à *L. monocytogenes* (Doumith e col. 2004, Buchrieser e col. 2003). Sua importância, porém, é justificada pela gravidade com que acomete populações consideradas de risco, que podem sofrer graves consequências decorrentes da infecção por ela causada. Pessoas acima de 70 anos de idade, alcoólatras, diabéticos, anêmicos, gestantes, pacientes com câncer, AIDS, lupus ou leucemia, bem como aquelas submetidas a transplantes são consideradas como grupos de risco. (Hof 2003a) Uma boa resistência imunológica é essencial para combater a infecção por *L. monocytogenes* (Peters e col. 2003; Allerberger 2002; Kamm e col. 2003; Buchrieser e col. 2003; Doumith e col. 2004).

Por muitos anos a epidemiologia da listeriose foi uma grande incógnita e os isolados da bactéria em laboratórios não passavam de poucos achados, sem grande importância. No início da década de 1980 o aumento de ocorrência de surtos de listeriose nos EUA e Europa demonstraram tratar-se de uma doença de grande importância em saúde pública. (Vasquez-Boland e col. 2001; Hof 2003a).

Ao longo das últimas décadas a sorotipagem vem sendo largamente utilizada para o diagnóstico de listeriose, porém apresenta limitações em

relação ao tempo exigido para obtenção de resultados e principalmente em relação à sua eficiência na detecção de todos os sorotipos presentes nas amostras analisadas, dificultando assim, as investigações de surtos, além dos procedimentos de diagnóstico, terapêutica e prevenção (Byun e col. 2001; Beumer e col. 2003).

A dificuldade de recuperar organismos envolvidos nos surtos; a subnotificação e a demora na realização de análises convencionais são alguns dos importantes fatores que retardam ou impedem interações em situações de emergência.

Nos últimos anos, porém, as técnicas moleculares de seqüenciamento genético, e principalmente as análises genéticas comparativas, vêm promovendo um grande avanço na precisão e rapidez, para a obtenção de dados relativos ao patógeno, no que se refere ao entendimento de sua biologia, fatores de virulência, evolução, diferenças fenotípicas e, conseqüentemente, nas ações de diagnóstico e prevenção. (Vasquez-Boland e col. 2001, Byun e col. 2001, Rocourt e col. 2003, Beumer e col. 2003, Buchrieser e col. 2003).

Wagner & Allerberger, 2003, recomendam cuidados na interpretação de resultados quando da investigação de surtos de listeriose, devendo ser considerados fatores como: coleta dos alimentos suspeitos; distribuição geográfica dos casos e duração do surto. A vigilância epidemiológica, inclusive internacional, faz-se necessária pelos fatores principais:

a) o longo tempo de incubação da doença permite a disseminação do contaminante;

- b) grau de contaminação do alimento;
- c) condição imunológica da população atingida;
- d) hábitos de consumo; e,
- e) virulência da cepa envolvida. (Wagner & Allerberger 2003).

Muitos casos de listeriose, como os pesquisados por Wagner & Allerberger 2003 em amostras clínicas na Áustria, ocorrem esporadicamente, com difícil identificação de causas de ocorrência.

Nos países desenvolvidos, e mesmo em alguns países em desenvolvimento, o isolamento a partir dos alimentos é de notificação obrigatória e suas legislações vigentes não permitem a presença do microrganismo em nenhum tipo de alimento para consumo humano (Rocourt e col. 2003).

No Brasil, a legislação federal em vigor que contempla os Padrões Microbiológicos para Alimentos está expressa na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, sob nº 12, de 01/01/2001. De acordo com essa Resolução, não é permitida a presença do patógeno em carnes cruas.

Embora a *L. monocytogenes* também venha sendo objeto de pesquisas bem sucedidas no Brasil, as quais vêm utilizando técnicas moleculares (Gasnov e col. 2005; Rodrigues 2002; Destro e col. 1996; Silva e col. 2001), o país ainda carece de novos trabalhos sobre a incidência, comportamento e causas de contaminação deste microrganismo, sobretudo por conta da sub-notificação dos casos da doença.

1.3 - QUADRO CLÍNICO

No início da infecção, a listeriose assemelha-se a um resfriado comum, acompanhado de febre, dores musculares e distúrbios gastrintestinais. Quando a infecção atinge o sistema nervoso, podem ocorrer sintomas como dor de cabeça, torcicolo, confusão mental, perda de equilíbrio e convulsões.

1.3.1 Septicemia

Geralmente sem infecção localizada a septicemia caracterizada por febre, náusea, vômito e mal estar (Vasquez-Boland e col. 2001). Dagonay 2003 identificou a septicemia em 15 casos de 32 avaliados entre os anos de 1987 a 2001 na Turquia.

1.3.2 – Infecção do Sistema Nervoso Central

O tropismo pelo cérebro e medula justifica a alta incidência de meningite e meningoencefalite nos casos de infecção do sistema nervoso central, acompanhado de febre alta, rigidez na nuca e desordens motoras (Doganay 2003, Vasquez-Boland e col. 2001). Doganay identificou 13 casos de meningoencefalite e 3 meningite nos 32 episódios de meningoencefalite e 3 de meningite em 32 casos estudados, constatando que 10% dos casos acometidos pela infecção neurológica apresentavam abscessos cerebrais. (Doganay 2003)

1.3.3 – Endocardite

A endocardite é observada em 8% dos pacientes adultos acometidos, que apresentam cerca de 50% de taxa de mortalidade. (Doganay 2003; Vasquez-Boland e col. 2001).

1.3.4 – Gastreenterite

Os adultos saudáveis que consomem alimentos contaminados por *L. monocytogenes* podem apresentar uma gastroenterite febril auto limitante, após 24 a 48 h de incubação. (Doganay 2003; Vasquez-Boland e col. 2001)

1.3.5 – Infecção Localizada

A *L. monocytogenes* pode ainda causar infecções localizadas como conjuntivite, dermatite e linfadenite. Estas infecções podem dar origem a complicações, como peritonite, coledoco cistite, hepatite, pleurite, abscesso esplênico, pericardite, osteomielite e endoftalmite. Pacientes com infecção localizada geralmente são portadores assintomáticos do patógeno (Doganay 2003; Vasquez-Boland e col. 2001).

1.3.6 – Infecção na Gestação

Gestantes possuem doze vezes mais chances de serem acometidas pela listeriose em relação à população em geral (Hof 2003a). Embora a gestante não manifeste sintomas preocupantes, as probabilidades de aborto e parto prematuro são grandes, em função da invasão da placenta pela bactéria, atingindo o feto, que ainda não dispõe de sistema imunológico capaz de se defender do agente (Abram e col. 2003; Doganay 2003; Vasquez-Boalnd e col. 2001). Embora possa se manifestar ao longo da gestação, é mais comum no último trimestre da gravidez. (Doganay 2003) Os sintomas mais comuns da infecção gestacional são: febre, dores de cabeça, mialgia, artralgia e mal estar. Cerca de 20% dos casos resulta em aborto, parto prematuro ou morte neonatal. (Doganay 2003). A *L. monocytogenes* é considerada a terceira causa de meningite em recém-nascidos (Vasquez-Boland e col. 2001).

Abram e col. 2003 evidenciaram baixa resposta imunológica de animais prenhes, quando submetidos ao contato com o patógeno, em situação experimental em teste de Murine. Os autores consideram o modelo de Murine indicado para o estudo de mecanismos de imunidade de animais de laboratório, quando infectados por patógenos intracelulares (Abram e col. 2003; Peters e col. 2003).

Smerdon e cols, 2001, pesquisaram 543 casos de listeriose, na Inglaterra, no período entre 1995 e 1999, dentre eles, 91 gestantes. Dos 452 não gestantes, 72% eram pacientes hospitalizados; 31% usuários de

medicamentos imuno-supressores; 21% idosos acima de 60 anos. Dos 91 casos de listeriose em gestantes, os autores concluíram que 5,5% apresentavam condições de saúde debilitadas e 26% decorreram em morte fetal ou neonatal. Foram identificados 2% dos casos decorrentes de contaminação cruzada neonatal.

Hofer e cols, 1998, confirmaram pelos métodos fenotípicos 3 casos de meningite causada por *L. monocytogenes*, em Brasília, DF.

Schwab & Edelweiss, 2003, pesquisaram com técnica histológica convencional 254 placentas, provenientes de aborto, de parto prematuro e de nascimento a termo em Porto Alegre, RS. A partir dos resultados encontrados, foram selecionadas 148 placentas que apresentaram infiltrado inflamatório, hemorragia, necrose e trombose e, nestas, foi procedido o teste imunohistoquímico (IHQ) para identificação de *L. monocytogenes*. Das 148 amostras analisadas foram encontradas *L. monocytogenes* em 50 delas (33,7%), das quais 66,6% eram resultantes de aborto e 33,3% de parto prematuro.

Em outro estudo Schwab & Edelweiss, 2003, cinco de dez placentas humanas analisadas pela técnica de IHQ apresentaram resultados positivos para *L. monocytogenes*.

Benshushan e cols., 2002 desenvolveram um estudo retrospectivo com 65.022 parturientes, durante o período de 1990 a 1999, em Israel, e identificaram 11 parturientes com listeriose. Os autores concluíram que a listeriose em gestantes apresenta altos riscos de graves perigos ao feto e

recém nascidos, a partir de resultados descritos: 36,3% de complicações na gestação; 18,1% de aborto; 36% de parto prematuro e 11,9% de óbito neonatal.

Siegman-Igra e cols, 2002, em Israel, pesquisaram 161 casos de listeriose, sendo 43% de infecção perinatal, destas 45% resultando em óbitos. Os demais casos envolveram pacientes imunodeprimidos, portadores de doenças crônico - degenerativas, em geral, que apresentaram como sintomatologia iniciais bacteremia (47%) e meningite (28%), resultando em óbito 38% dos casos.

Um estudo de caso conduzido por Laciari e cols, 2000, identificaram pelo método PFGE o mesmo perfil genotípico de *L. monocytogenes* de amostras da vagina da mãe infectada e sangue do recém-nascido, que apresentava meningite, septicemia hidrocefalia severa.

1.4 – CARACTERÍSTICAS

1.4.1 - Taxonomia

Segundo o “BERGEY’S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY” (1984) as bactérias do gênero *Listeria* são Gram positivas, não esporogênicas, móveis quando a temperaturas entre 20 a 25 C. Apresentam crescimento entre 1° e 45° C, com ótimo de temperatura de 30° a 37° C (Seeliger & Jones 1987).

A sorotipagem é baseada em 15 antígenos somáticos (“O”) e cinco flagelares (“H”). A espécie *L. grayi* contém os antígenos “O” e “H”. (Seeliger & Jones 1986).

As primeiras descobertas a respeito da *Listeria* são datadas de 1924, quando E.G.D. Murray isolou bastonetes Gram positivos, que não se classificavam em nenhum gênero estudado até então, a partir do sangue de animais de laboratório (Hof 2003a). Em 1940, Perie trabalhando com amostras de alimentos, sangue humano e ambientais, incluiu o bastonete Gram positivo, catalase positivo, no gênero *Listeria* (Hof 2003a; Allerberger 2002). Todavia, antes do surto ocorrido em recém-nascidos na Alemanha em 1949, a bactéria não representava grande importância clínica. Classificada inicialmente como *Corynebacterium*, a bactéria foi identificada em outros surtos ocorridos simultaneamente na Alemanha, sendo a seguir corretamente classificada dentro do gênero *Listeria* em função de sua motilidade, incompatível com o gênero *Corynebacterium*. Foi nessa ocasião que se iniciou o estudo da listeriose humana.

Por várias décadas imaginou-se existir uma única espécie de *Listeria*, denominada *monocytogenes*. A partir de Rocourt, 1983, através de métodos bioquímicos e mais recentemente, métodos moleculares, foram classificadas outras espécies da bactéria (Rocourt e col. 2003; Hof 2003a).

A *L. monocytogenes* é a única espécie considerada patogênica ao ser humano, sendo as demais: *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. ivanovii*, *L.*

grayi e *L. murray*, esta última é considerada atualmente pertencente à espécie *grayi*. (Hof 2003a).

A *L. monocytogenes* é caracterizada como importante patógeno transmitido através da ingestão de alimentos contaminados, especialmente os produtos de origem animal.

Atualmente considera-se a *L. monocytogenes* patogênica não apenas para humanos, mas também para animais, pois é encontrada em várias espécies. (Hof 2003a, Vasquez-Boland e col. 2001). Outros fatores preponderantes para considerar a *L. monocytogenes* como um agente de relevância para a saúde pública são suas características metabólicas e fisiológicas, como a capacidade de se multiplicar a temperaturas de refrigeração a 5° C, bem como a 40° C. Altamente adaptadas ao ambiente, a bactéria também possui capacidade de sobrevivência em elevadas concentrações de Cloreto de Sódio e nitritos, a vários antibióticos e ampla faixa de pH (entre 4,3 e 9,6). Estas características associadas à capacidade de formar biofilmes tornam o gênero de especial importância para a indústria de alimentos (Aguado e col. 2004; Destro e col. 1996).

Mais recentemente pesquisadores vêm desenvolvendo estudos sobre os fatores de virulência e o seqüenciamento genético da *L. monocytogenes*, trazendo grandes contribuições os estudos sobre a bactéria (Vasquez-boland e col. 2001). Os estudos de hibridização DNA/DNA e de seqüências de RNA que contém regiões conservativas, as quais são idênticas para organismos relacionados filogeneticamente, como, por exemplo, o seqüenciamento do 16

rDNA e regiões intergênicas do 16-23S, são técnicas que vem sendo utilizadas com ótimos resultados para fins taxonômicos.

Apesar das recentes conquistas, algumas questões ainda aguardam resposta a partir de maior quantidade de pesquisas, tais como:

a) Qual o papel dos genes relacionados à Internalina na biologia e virulência da *L. monocytogenes*?

b) Por que a bactéria infecta preferencialmente o sistema nervoso central e a placenta?

c) Por que certos sorotipos causam listeriose e certos clones de sorotipo 4b são responsáveis por epidemias de infecções invasivas?

d) Por que mulheres grávidas não desenvolvem meningoencefalite ou septicemia, quando acometidas pela infecção? e,

e) Quais os verdadeiros mecanismos de invasão celular durante a proliferação intracelular da bactéria? Estas e outras questões a respeito do complexo mecanismo desta versátil bactéria deverão ser respondidas nos próximos anos, promovendo grandes avanços no entendimento do parasitismo celular deste e outros microrganismos. (Vasquez-Boland e col. 2001; Gasanov e col. 2005)

1.4.2 – Ação Intracelular

Acredita-se que um determinado grupo de bactérias possa parasitar o meio intracelular da célula hospedeira, determinando seu intercâmbio e

interação. O deciframento desta comunicação é o objetivo dos pesquisadores atualmente, para entender o mecanismo de atuação intracelular da bactéria, em especial da *L. monocytogenes*. (Gasarov e col., 2005; Vasquez-Boland e col. 2001; Hof 2003a, Peters e col. 2003; Pizarro-Cerdá e cols, 2003).

Estudos indicam que a ação intracelular da bactéria é uma das principais causas que dificulta a terapêutica por meio de antibióticos, embora a *L. monocytogenes* seja sensível a grande parte deles. Esta característica é agravada pelo fato de que a maioria dos acometidos pela listeriose são imunocomprometidos (Hof 2003b)

Por muitos anos, não houve grandes mudanças no perfil de sensibilidade aos antibióticos deste microrganismo, isolado em países industrializados. Recentemente, entretanto, alguns relatos têm descrito cepas resistentes a cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, tetraciclina, vancomicina e trimetropina. Esse perfil de resistência também tem sido comum em cepas isoladas de alimentos. Essas investigações sugerem que está lentamente se tornando resistente aos antibióticos por conta da aquisição de genes conhecidos de resistência de bactérias Gram positivas (Aureli 2003).

Faz-se necessário, portanto, implementar um sistema de monitoramento da emergência e da propagação desta resistência bacteriana aos antimicrobianos (Aureli 2003).

1.4.3 – Fontes

A *L. monocytogenes* encontra-se amplamente distribuída no ambiente, sendo encontrada no solo, na vegetação, na água e no esgoto; foi isolada também de pelo menos 37 espécies de mamíferos, assim como de 17 espécies de pássaros e possivelmente de algumas espécies de peixes e crustáceos. Acredita-se que de 1% a 10% da população seja portadora intestinal deste patógeno (Hof 2003a).

Em relação à sua incidência nos alimentos, a *Listeria monocytogenes* já foi recuperada de uma variedade de alimentos, tanto crus, como processados. Entre esses alimentos, incluem-se leite e queijos, supostamente pasteurizados inclusive, carnes e produtos cárneos, vegetais crus, frutos do mar e pescado (Laciar e col. 1999).

Sabe-se que os primeiros surtos de listeriose humana estiveram associados a produtos lácteos ou vegetais contaminados (Hof 2003a). Considera-se que 85 a 95% dos casos de listeriose são originários da contaminação alimentar, especialmente aqueles prontos para o consumo (Martinez e col. 2003; Rocourt e col. 2003). A presença da bactéria posteriormente passou a ser identificada em produtos cárneos, incluindo os de origem bovina e avícola, bem como no pescado (Destro e col. 1996; Martinez e col. 2002; Farber & Peterkin 1991). Incidências de 41 a 84% em carcaças bovinas e frango cru; zero a 60% em frango processado e prontos para o consumo (Martinez e col. 2003; Lawrence & Gilmour 1994; Uyttendale e col. 1999; Aguado e col. 2004). Esses tipos de alimentos devem ser, também,

considerados como fonte potencial deste patógeno devido a sua ampla distribuição nos ambientes de processamento e à sua capacidade de sobrevivência e multiplicação em temperaturas de refrigeração (Vasquez-boland e col. 2002; Germano & Germano 2001; Alpas & Bozoglu 2003; Rocourt e col. 2003).

Segundo a literatura, quando o microrganismo está presente nos alimentos, sua concentração é geralmente baixa, cerca de 10^2 células/mL ou grama de alimento, sendo que muitas vezes, seu crescimento pode ser sobrepujado pela microflora acompanhante, porém quando sob condições adequadas, o patógeno pode atingir altos níveis (Dykes 2003). Estima-se que, teoricamente, uma única bactéria seja capaz de causar doença, segundo estudos de dose-infectante da *L. monocytogenes* (Rocourt e col. 2003; Buchanan & Lindqvist 2000; FAO/WHO 2001).

Embora presente no ambiente e na matéria prima alimentar, uma das maiores fontes de contaminação dos produtos alimentícios é o próprio processo de produção. A colonização de equipamentos e utensílios tem sido relatada como a principal causa de contaminação do produto acabado (Martinez e col. 2003; Destro 1996; Nakamura e col. 2004; Aguado e col. 2004). Diversos estudos concluíram que o perfil genético do produto acabado não é o mesmo da contaminação inicial da matéria-prima, mas em muitos casos é semelhante aos isolados de máquinas e utensílios utilizados na produção (Martinez e col.

2003; Destro 1996; Nakamura e col. 2004; Aguado e col. 2004; Vogel e col. 2001).

1.4.4 – Formas de Transmissão

A resistência aos fatores adversos, como pH, e a habilidade do microrganismo em multiplicar-se à temperatura de refrigeração, podendo ser recuperado após longos períodos de congelamento, indica um fator crítico na transmissão da listeriose, principalmente através de alimentos de origem animal, cujo processo mais freqüente e eficiente de conservação é a refrigeração (Vasquez-Boland e col. 2001; Forsythe 2002). Neste caso, as baixas temperaturas atuam selecionando culturas de *L. spp* pela inibição da microbiota competitiva, importante antagonista da contaminação dos alimentos por este patógeno (Forsythe 2002).

A mudança de hábitos alimentares, principalmente no que se refere ao consumo de alimentos “naturais”, livre de aditivos, orgânicos e até mesmo a ingestão de carnes cruas em algumas comunidades, é um dos maiores fatores responsáveis pelo aumento do risco da ocorrência de listeriose humana.

Os produtos clandestinos também representam importante via de transmissão do patógeno, uma vez que não sofrem nenhum controle de qualidade, a não ser aceitação ou rejeição por parte do consumidor no momento da aquisição.

O hábito higiênico nos processos de produção, conservação, preparo e consumo, associado à contaminação das instalações, equipamentos, utensílios e dos próprios alimentos, bem como a eficácia dos processos de conservação e desinfecção, são fatores críticos para a disseminação de *L. monocytogenes*.

Nakamura e col. 2004 pesquisando contaminação de *L. monocytogenes* identificaram 12 amostras de salmão e trutas defumadas em 95 contaminadas por essa bactéria. Utilizando métodos moleculares identificaram que as cepas originárias de cada planta de processamento analisada eram geneticamente semelhantes, indicando contaminação persistente nos equipamentos.

Martinez e col. 2003 pesquisaram o perfil genotípico de *L. monocytogenes*, pela técnica de Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD), de 432 amostras de alimentos, ambiente, animais, seres humanos, a fim de estabelecer relação entre o contaminante e a presença de listeriose. O trabalho também teve como finalidade identificar semelhanças entre grupos de bactérias presentes no produto e respectiva planta de processamento. Os autores não encontraram relação entre os achados clínicos. Com referência às plantas de processamento, houve evidências de contaminação persistente.

Vogel e col. 2001 compararam 148 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de salmão e truta defumados e embaladas a vácuo, proveniente de 10 diferentes plantas de processamento. A semelhança genética entre as cepas originárias de diferentes plantas, conduz à suposição de que há uma facilidade de adaptação da bactéria ao ambiente, ou há maior prevalência de determinadas cepas no ambiente. Essa suposição é sustentada por Gilbreth e

col., 2005, que concluíram maior prevalência em alimentos do sorotipo 1 / 2 a e 1 / 2 b, representados por 298 e 133 isolados, respectivamente, em um total de 502 cepas provenientes de 31.705 alimentos prontos para o consumo, coletados nos Estados Unidos da América, no período de 2000 a 2001. Diferente e inesperadamente, Leite e col. 2005 observaram uma maior prevalência do sorotipo 4b (69,1%) em 94 isolados de queijo e ambiente. Os autores supõem que essa característica seja proporcionada pelo tipo de queijo analisado – queijo cremoso – que possivelmente permita maior sobrevivência e multiplicação de cepas de sorotipo 4b.

A qualidade sanitária dos alimentos, principalmente os de origem animal, está intimamente ligada à monitoração e controle dos riscos de contaminação em toda a cadeia produtiva. Este controle é eficaz quando executado por mão-de-obra treinada, capacitada e habilitada para tanto, sendo supervisionada rigorosamente por técnico especializado (Forsythe 2002). Ressalta-se, portanto, a importância da adoção das ferramentas da qualidade para produção de alimentos. As Boas Práticas de Fabricação e o APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) mostram-se eficientes no controle da listeriose e são aplicados e reconhecidos em âmbito mundial (Choi e col. 2003; Rocourt e col. 2003; Farber e col., 2003).

1.4.5 – Análise de risco

A análise de risco é uma nova e poderosa ferramenta delineada a partir do estudo de dados obtidos ao longo da cadeia produtiva, do cultivo até o consumo e sua relação com as doenças transmitidas pelos alimentos, com a finalidade de mensurar o impacto de determinado alimento contaminado.

A FAO Food and Drug Organization e a OMS Organização Mundial da Saúde promoveram estudos de análise de risco de alguns patógenos mais freqüentemente envolvidos em surtos, tais como *Salmonella* em ovos e frango grelhado, *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo, *Campylobacter* em frango grelhado e *Vibrio* em pescado. O intuito destes estudos foi o de reduzir os riscos de impacto à saúde pública, através da criação de procedimentos desde o cultivo do alimento até sua comercialização no comércio internacional obedecendo a rigorosos padrões de qualidade. Rocourt e col. 2003 afirmam que pela primeira vez na história surge a possibilidade de estimar quantitativamente os riscos microbiológicos do impacto da contaminação do alimento na saúde pública.

A análise de risco para *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo proposto pela FAO/OMS teve inicialmente o papel de orientar sobre como os padrões nacionais poderiam se igualar aos internacionais. Ao mesmo tempo, propõe-se a determinar três principais aspectos relacionados ao consumo de alimentos prontos para o consumo, a saber:

a) análise de risco para populações suscetíveis (recém-nascidos, gestantes, imunocomprometidos e idosos);

b) análise de risco para diferentes alimentos, quanto à capacidade de multiplicação da bactéria;

c) determinar limites de contagem microbiana, quando da não presença em até 25 gramas ou mililitros de alimento. Como resultado dessas ações, espera-se determinar novas doses infectantes da bactéria em alimentos prontos para o consumo.

Apesar de reconhecer a atual contribuição à saúde pública que a análise de risco para *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo, Rocourt e col. 2003 sinalizam para uma lacuna entre a produção ao consumo do alimento, sugerindo pesquisas nos estágios anteriores ao consumo. Dessa forma, destaca como imprescindível o desenvolvimento de pesquisas nas seguintes etapas:

a) prevalência de *L. monocytogenes* na agricultura e no meio aquático;

b) prevalência na produção primária e secundária de alimentos;

c) variabilidade de virulência de *L. monocytogenes*;

d) desenvolvimento de modelos preditivos para determinados alimentos;

e) identificação de fontes e níveis de contaminação e recontaminação;

f) prevalência e concentração em embalagem final de alimentos prontos para o consumo; e,

g) porcionamento e instruções para o consumo e manuseio de alimentos prontos para o consumo, especialmente para populações de risco.

1.5 – FATORES DE VIRULÊNCIA E PATOGENIA

A tipagem de *L. monocytogenes*, entre outros aspectos, é necessária para a identificação de fatores de virulência, que determinam a patogenia da cepa.

Curiosamente, alguns achados revelam que o sorotipo que provoca a doença não é o mesmo encontrado em alimentos supostamente incriminados em surtos. Atribui-se à diferença de capacidade de sobrevivência e adaptação de determinados sorotipos no alimento (Malak e col. 2001; Buchrieser e col. 2003; Wagner & Allerberger 2003).

Diversas técnicas de tipagem molecular classificam as características filogenéticas da bactéria em dois grandes grupos. A divisão I compreende os sorotipos 1 / 2 b, 3b, 4b, 4d e 4e; a divisão II compreende os sorotipos 1 / 2 a, 1 / 2 c, 3 a e 3c. Existe ainda um terceiro grupo menos comum de sorotipos 4 a e 4 c. apesar de mais de 14 sorotipos terem sido descritos, apenas três (1 / 2 a, 1 / 2 b e 4 b) estão relacionados com a ocorrência da doença. Paradoxalmente o sorotipo 1 / 2 a é freqüentemente isolado de alimentos e o 4 b de epidemias (Borucki & Call 2003).

A descoberta do gene hemolisina (*hly*), na década de 80, contribuiu muito na elucidação não apenas dos fatores de virulências associadas ao mecanismo de parasitismo intracelular, mas de várias outras funções da interação da bactéria no hospedeiro (Vasquez-Boland e col. 2001).

Dentre vários fatores de virulência, destaca-se o grupo de genes que reúne as Internalinas. Exclusivas da espécie *L. monocytogenes*, considera-se que as internalinas sejam responsáveis pelas características de invasão celular e tropismo no hospedeiro (Vasquez-Boland e col. 2001).

1.6 - CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA

1.6.1 – Métodos Fenotípicos

O diagnóstico laboratorial de em alimentos inclui: métodos microbiológicos, sorológicos e moleculares. Avanços significativos nos meios de cultura para enriquecimento seletivo e nos procedimentos para isolamento têm sido alcançados na última década, entretanto esses métodos são demorados, trabalhosos e não detectam baixos níveis de contaminação por esta bactéria. Face ao comportamento atípico de algumas cepas, tem sido reavaliada a utilização de métodos fenotípicos para a taxonomia, que em geral a diferem em uma ou mais provas. Ainda importante é a variabilidade existente entre uma mesma espécie para determinada característica, que dificulta o posicionamento taxonômico de determinadas espécies bacterianas. Outra desvantagem é o crescimento rápido no meio de enriquecimento seletivo de *L. innocua*, outra espécie de *Listeria*, entretanto não tão patogênica quanto a *monocytogenes*, e que é mais freqüentemente isolada de alimentos. Recentemente, um grande

número de novos métodos analíticos para detecção rápida de têm sido propostos, incluindo métodos imunológicos e os métodos baseados no seu ácido nucléico (Gasanov e col. 2005).

Os métodos de tipagem mais freqüentemente utilizados são a biotipagem e a sorotipagem, mas não apresentam suficiente poder discriminatório. A sorotipagem tem sua aplicação limitada em função do pequeno número de sorovares encontrados (Gasanov e col. 2005; Holko e col. 2002).

A fagotipagem permite a distinção entre linhagens pertencentes a um mesmo sorogrupo, ou mesmo sorovar, mas ainda assim é freqüente a existência de linhagens não tipáveis. A principal limitação de seu emprego é a exigência de laboratórios altamente especializados, dificultando assim seu emprego rotineiro. (Gasanov e col., 2005; Holko e col., 2002).

Os métodos convencionais que utilizam modelos animais, embora permitam determinar determinada toxicidade, pela presença de fatores de virulência, oferecem algumas restrições. Jung e col. 2003 afirmam que métodos imunológicos apresentam baixa especificidade e pode gerar resultados falso-positivos, o mesmo constatado por Grif e col. 2001, sem explicação aparente, quando da utilização da cultura em placa com amostras de fezes de pessoas saudáveis, da Áustria, utilizando vários métodos de pesquisa.

Beumer e col. 2003 discutem as vantagens dos métodos moleculares, comparativamente aos tradicionais de pesquisa de *L. monocytogenes*. Os autores propõem o sistema ISO International Organization for Standardization como padrão para comparações entre os vários métodos. Os autores destacam

os riscos de perda de animais em decorrências de septicemias provocadas por contaminação de bactérias oportunistas durante o desenvolvimento do método. Afirmam, ainda, que o enriquecimento a frio é mais indicado, porém com período de duração muito longo, inviabilizando diagnósticos mais imediatos (Beumer e col. 2003; Garrec e col. 2002). Os autores consideram que o sucesso dos três protocolos básicos de pesquisa de *L. monocytogenes*, constituídos por:

a) cultura em meio seletivo;

b) enriquecimento; e,

c) pré-enriquecimento depende da contagem inicial da bactéria; a seletividade do meio, de forma a permitir o crescimento do patógeno pesquisa e inibição de outros competidores, condições de incubação e a capacidade de seletividade do meio.

Diversos autores afirmam que métodos tradicionais de pesquisa de *L. monocytogenes* são demorados e pouco específicos, além de não permitir a identificação do patógeno quando em baixas contagens na amostra. Embora não possam ser totalmente abolidos, os métodos convencionais vêm sendo cada vez mais substituídos pelas técnicas moleculares, face ao seu grau de especificidade, rapidez e reproduzibilidade (Allerberger 2002; Alpas & Bozoglu 2003; Somer & Kashi 2003; Aguado e col. 2004; Vasquez-Boland e col. 2001; Borucki & Call 2003; Byun e col. 2001; Beumer e col. 2003; Wagner e Allerberger 2003; Malak e col. 2001; Gasanov e col. 2005).

1.6.2 – Métodos Genotípicos

Na atualidade as moléculas de DNA e o RNA são facilmente extraídas das células, purificadas e analisadas, demonstrando uma evolução em relação há décadas passadas, nos primórdios da biologia molecular (Matté 2003).

O DNA e o RNA são macromoléculas organizadas em cadeias unidades monoméricas chamadas nucleotídios, compostas por:

- a) uma base nitrogenada que é, também, um derivado pirimídico ou purínico – adenina, citosina, guanina e timina para o DNA e adenina, guanina, citosina e uracil para o RNA;
- b) uma pentose, 2-desoxi-D-ribose para o DNA e D-Ribose para o RNA; e,
- c) uma molécula de ácido fosfórico.

O DNA tem uma estrutura de dupla hélice, na qual duas cadeias de polinucleotídios são dispostas de tal forma que a sustentação é feita por fosfatos e resíduos de açúcares alternados, de modo que a base se projete perpendicularmente a um eixo central. As bases das duas cadeias são então unidas, especificamente, por pontes de hidrogênio, de forma que a adenina possa ligar-se apenas com timina e a citosina com guanina.

Os métodos genotípicos estão baseados na análise destas duas moléculas (DNA e RNA). Dentre as várias vantagens destacam-se a dispensa de uma identificação completa desses organismos pelos métodos fenotípicos, os fundamentos analíticos são sempre os mesmos e podem ser aplicados a

qualquer amostra e, também, muitos procedimentos são de simples realização (Matté e col. 2005).

Os métodos fenotípicos dependem da expressão de certas características bacterianas, as quais podem ser variáveis; já os métodos moleculares permitem a observação direta dos genótipos, o que proporciona a interpretação com base em dados altamente reprodutíveis. (Matté e col. 2005)

O comitê *ad doc* para reavaliação da definição de espécies em bacteriologia sugeriu a introdução de métodos rápidos de tipagem do DNA, como AFLP, RAPD, rep-PCR e PFGE, que tem como alvo o cromossomo como um todo, os que estudam um grupo de genes, genes individuais e regiões intergênicas (Matté 2003).

Os recentes avanços no campo da biologia molecular têm contribuído de forma significativa para o estudo da taxonomia, biodiversidade microbiana, epidemiologia molecular elucidando a relação entre cepas clínicas e ambientais, demonstrando a clonalidade, biodiversidade, rotas de propagação, variações geográficas, e estabelecimento de padrões e métodos preventivos baseados na microbiologia predictiva e análise de risco. (Rocourt 2003; Buchrieser e col. 2003; Hof 2003a, Beumer e col. 2003; Wagner & Allerberger 2003; Gasanov e col. 2005)

A identificação dos fatores de virulência a partir da identificação de determinadas características genéticas das espécies, como a presença do gene *Internalina*, tem elucidado a patogenicidade da bactéria estudada. (Hof 2003a; Buchrieser 2003; Borucki & Call 2003).

A partir de um banco de dados é possível ser feita uma identificação de similaridade ou ineditismo de determinados organismos, a fim de confirmar ou não as espécies pesquisadas. (Matté 2003).

Diversos métodos moleculares vêm sendo empregados para genotipagem de *L. monocytogenes*. Dentre eles podem ser citados:

1.7 – APLICAÇÃO DOS MÉTODOS MOLECULARES PARA O ESTUDO DA ESPÉCIE *L. MONOCYTOGENES*

1.7.1 - Eletroforese em campo pulsado (“Pulsed-field gel eletroforesis”)

A técnica PFGE é utilizada por muitos pesquisadores porque apresenta maiores vantagens em relação ao tratamento do DNA na extração e na clivagem com enzimas de restrição, as bandas e os perfis são melhor visualizados.

Nakamura e col. 2004 utilizaram o método PFGE para tipificação de 13 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de salmão e truta prontos para o consumo, em Osaka, Japão, identificando cinco diferentes genotipias. Os resultados indicaram ainda que cepas semelhantes foram identificadas em alimentos originários do mesmo produtor, independentemente do tipo de produto e da data de produção, o que sugere contaminação ambiental nas plantas de processamento analisadas.

Wagner e Allerberger 2003, na Áustria, utilizaram PFGE em 41 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras clínicas de pacientes gestantes e recém-nascidos, de 3 amostras de fezes de pessoas aparentemente saudáveis e de nove amostras clínicas de epidemias de listeriose da Europa e EUA. Os resultados identificaram perfil genotípico semelhante entre 37 das 41 cepas das amostras clínicas da Áustria e cinco das nove cepas provenientes de epidemias de listeriose. Os autores recomendam que a vigilância epidemiológica utilize-se de métodos moleculares para fins de prevenção, bem como rápidas intervenções nas ocorrências de casos e epidemias de listeriose.

Grif e col. 2001, na Áustria, utilizando o método PFGE, identificaram três diferentes perfis genotípicos de 62 cepas isoladas de amostras clínicas de quatro pessoas aparentemente saudáveis e de duas cepas isoladas de amostras clínicas de um caso de listeriose. Embora as cepas provenientes de pessoas aparentemente saudáveis serem geneticamente semelhantes, não houve confirmação de relação epidemiológica entre elas. Os autores supõem ter havido o consumo, pelas três pessoas, de alimentos contaminados pela mesma cepa de origem.

Vogel e col. 2001 utilizaram o método PFGE na pesquisa de 20 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras de salmão defumado embalado a vácuo, provenientes de dez diferentes plantas de processamento da Dinamarca. A técnica foi bem sucedida e demonstrou maior especificidade na tipificação das cepas em relação a outros métodos moleculares.

Destro, em 1996, empregou a técnica PFGE em 115 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras de equipamentos, ambiente e camarões de uma planta de processamento de camarão congelado em Santos, São Paulo. O estudo demonstrou que o perfil de DNA das áreas de recepção de matéria prima era distinto do perfil das demais áreas, sugerindo um tipo de contaminação originária da matéria-prima e outro de contaminação persistente nas áreas de produção. O método foi considerado sensível, reprodutível e pouco susceptível a variações. Como ponto negativo foi destacado o longo tempo empregado, comparativamente ao método RAPD.

Farber e col., 2003 investigaram um pequeno surto de *L. monocytogenes* em produtos derivados de caranguejo e constaram a clonalidade microbiológica entre as cepas presentes nos alimentos da geladeira e amostras clínicas da paciente. Utilizando a enzima *AscI* identificaram um perfil de similaridade de 100%. Os autores constataram que nesse surto a dose infectante foi de 10^6 , mas varia de pessoa a pessoa, como no caso da visitante da paciente que ingeriu o mesmo produto, mas não apresentou sintomas.

Rijpens e col. 1998, analisaram pelo método PFGE 4 cepas identificadas supostamente como *L. monocytogenes*, isoladas de queijos na Bélgica, e constataram que nenhuma confirmou ser o patógeno, o que justificou a recomendação do uso de técnicas moleculares para a identificação.

Gilbreth e col. 2005, Estados Unidos da América, pesquisaram pela técnica de PFGE, com a utilização da enzima *AscI*, 502 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de 31.705 amostras de alimentos prontos para o

consumo e 42 cepas de amostras clínicas, totalizando 544 isolados, com o objeto de verificar relação de similaridade entre os fatores de regionalidade, estação climática, sorotipagem e tipo de amostra, se alimento ou clínica. De maneira geral, os autores encontraram grande diversidade genotípica em relação a todos esses fatores, mas identificaram algumas situações de similaridade entre as regiões originárias dos isolados; observaram os sorotipos mais freqüentemente encontrados em determinados tipos de alimentos e em amostras clínicas e identificaram maior prevalência do *L. monocytogenes* no verão na Califórnia, em relação às outras épocas do ano.

Leite e col. 2005 compararam o perfil genotípico de cepas originárias de queijo e de amostras clínicas, com base no método PFGE, utilizando a enzima *Apa I*. Foram analisadas 94 cepas isoladas de amostras de queijo e 15 de amostras clínicas de pacientes com listeriose, em Portugal. Foram identificados 25 perfis, sendo 15 de queijo e 10 provenientes de amostras clínicas. Os autores identificaram similaridade entre os perfis originários de amostras de queijo, sugerindo contaminação persistente e não houve relação de similaridade entre as cepas de origem alimentar e de origem clínica, não ficando estabelecida relação causal entre os casos de listeriose e a ingestão dos alimentos analisados. Curiosamente, os achados indicaram uma prevalência do sorotipo 4b(69,1%) nas cepas isoladas de alimento, contrariando várias pesquisas nas quais a prevalência é maior de sorotipo 1 /2 a e 1/ 2 b.

1.7.2 – Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Muitos métodos para classificação de cepas bacterianas estão baseados na amplificação do DNA por técnicas de PCR. De forma geral, duas classes de protocolos são empregadas:

O primeiro envolve a amplificação de um ou alguns poucos fragmentos de DNA que em seguida são seqüenciados ou analisados por métodos empregando enzimas de restrição, geralmente usados para taxonomia, identificação de genes de virulência e adesão. A análise de regiões intergênicas entre os segmentos 16 S e 23 S do RNA ou ainda regiões variáveis do RNA transportador (tRNA), podem ser amplificadas e analisadas em eletroforese em gel e, assim, estabelecer a relação entre seqüências de DNA conhecidas, que são diagnósticas para gêneros, espécies ou isolados. (Somer & Kashi 2003).

O segundo protocolo de PCR utiliza seqüências curtas do DNA, que vão ser utilizadas como iniciadores para amplificar numerosos fragmentos distintos do DNA genômico do organismo em estudo. Quando esses fragmentos são submetidos a um sistema eletroforético este resulta num padrão de bandas, gerando um perfil “fingerprinting”, semelhante às impressões digitais, de espécies ou isolados que podem ser específicos.

O PCR com o uso de iniciadores arbitrários (“arbitrary iniciadors-PCR”: AP-PCR) utilizar um conjunto universal de iniciadores pode ser utilizado para a análise do DNA genômico de uma variedade de espécies. É importante, porém

que antes da escolha do iniciador, testes preliminares sejam feitos com sondas de DNA, para verificar a presença de sua seqüência no DNA a ser estudado.

O PCR oferece maiores vantagens quando são utilizados iniciadores específicos, comuns para um determinado grupo de espécies. Essas seqüências repetitivas estão presentes nos genomas de todos os organismos, e podem ser utilizadas como iniciadores para determinação filogenética.

Doumith and col. 2004 utilizaram com sucesso o método PCR para identificação dos sorotipos em 222 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de alimentos e pacientes. Os autores indicam a técnica como mais rápida e prática em relação aos métodos convencionais.

Borucki & Call 2003 identificaram cinco diferentes sorotipos em 122 cepas isoladas de amostras de pessoas, animais e ambiente, provenientes dos Estados Unidos, Canadá e Europa, utilizando o método PCR.

Rijpens e col., 1998, analisaram pelo método PCR com identificação do gene 16S rRNA 4 cepas identificadas supostamente como *L. monocytogenes*, isoladas de queijos na Bélgica, e constataram que nenhuma confirmou ser o patógeno, o que justificou a recomendação do uso de técnicas moleculares para a identificação, além dos métodos convencionais.

Somer & Kashi 2003 desenvolveram a detecção simultânea de *Listeria spp* e *L. monocytogenes* em amostras de carnes e peixes crus e prontos para o consumo, salada de batata, salada de vegetais, patê de peixe e sorvete, com o emprego do método PCR, baseado no segmento 16S do gene rRNA. Foi utilizada uma seleção de iniciadores que distinguem as diferentes espécies de

Listeria spp. A técnica promoveu um alto grau de especificidade e simplicidade de execução, sendo recomendada pelos autores como rotina para análise de alimentos e possivelmente amostras clínicas.

Jung e col. 2003 utilizando o método PCR, com identificação do gene de virulência Internalina (*InlAB*), confirmaram a presença de *L. monocytogenes* em culturas e em amostras de alimentos artificialmente contaminados pelo patógeno.

Alpas & Bozoglu 2003 utilizaram PCR para a identificação de *L. monocytogenes* em planta de processamento de frutas, a fim de validar a eficiência de tecnologias de higienização ambiental. Os autores consideraram a técnica rápida e altamente específica para identificação de três genotipias de *L. monocytogenes*, a partir da análise do gene *iap*, recomendando seu emprego para estudos de contaminação ambiental na indústria de alimentos.

Jaradat e col. 2002 pesquisaram 30 cepas de amostras clínicas e de alimentos, isoladas ao longo de 15 anos, originárias de duas diferentes regiões geográficas, com o emprego do método PCR, para identificação dos genes *inlA*, *inlB*, *actA*, *hlyA*, *plcA* e *plcB*. Os autores identificaram polimorfismo apenas no gene *actA*. A semelhança genética observada nas cepas, aparentemente sem nenhuma relação epidemiológica, sugere uma grande distribuição na natureza de cepas de mesmo perfil genético.

Rijpens e col. 1998, analisaram pelo método PCR 4 cepas identificadas supostamente como *L. monocytogenes*, isoladas de queijos na Bélgica, e

constatarem que nenhuma confirmou ser o patógeno, o que justificou a recomendação do uso de técnicas moleculares para a identificação.

Piatti e col. 2004, pesquisando *L. monocytogenes* em amostras de caprino com sintomatologia nervosa, no Brasil, utilizaram a técnica PCR para identificação da presença do gene listeriolisina de 9 cepas presumivelmente de *L. monocytogenes* isoladas de cérebro, fígado, pulmão, e rins de 4 caprinos com sintomatologia nervosa. As amostras cultivadas com meios de enriquecimento seletivo e enriquecimento para *Listeria spp*, apresentavam presumivelmente características de *Listeria spp*, foram com testes complementares identificadas como *Streptococcus spp*. Apenas uma amostra, a proveniente do cérebro de um dos animais, foi identificada como *L. monocytogenes*.

Holko e col. 2002, utilizaram a técnica PCR para identificação do gene *prfA* em cepas isoladas de leite e derivados, sendo supostamente identificadas como *L. monocytogenes* pelo método STN ISO 10560 (1999). Analisadas 18 cepas anteriormente identificadas com *L. monocytogenes* com positividade a técnica de hemólise foram todas confirmadas pelo método de PCR. As vantagens destacadas pelos autores no emprego do método molecular é a rapidez, o que favorece grandemente a eficiência da vigilância epidemiológica. As cepas que haviam sido negativas nos testes de hemólise foram avaliadas por PCR e paralelamente em meio de cultura cromogênico. Foram avaliadas 42 cepas supostamente classificadas como *L. monocytogenes* e destas apenas duas foram confirmadas pelo método PCR e confirmadas pelo meio cromogênico, sendo identificadas como *L. inócu*a. Os autores destacam os

grandes riscos de interpretação equivocada de cepas como *L. monocytogenes*, tendo em vista que a espécie *L. innocua* está freqüentemente presente nos alimentos e alertam que o emprego do método exclusivamente hemolítico pode levar ao erro na identificação entre *L. innocua* e o patógeno em questão.

Grif e col., 2001 encontraram 3,6% de positividade na análise por PCR, comparados a 0,2% pelo método tradicional de plaqueamento para detecção de *L. monocytogenes*, a partir do enriquecimento de cultura de fezes de 505 voluntários sadios.

Rodrigues e col. 2002 utilizaram o método rápido PCR (Bax®) para detecção de *L. monocytogenes* em 413 amostras de ambiente, matéria prima, alimentos em diferentes estágios de processamento e mãos de manipuladores, todas provenientes de planta de processamento de *nugget*. Os autores identificaram que o método é mais eficiente em amostras de superfície e mãos de manipulador, podendo ser indicado para estes casos, mas não para amostras de alimentos, nos quais mostrou uma eficiência menor, quando comparado com métodos rápidos convencionais.

1.7.2.1 – RAPD

O RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é uma variação do PCR clássico e foi proposto por Williams e col. (1990) e por Welsh & McClelland 1990, para análise de DNA genômico de uma variedade de espécies.

Nakamura e col. 2004 utilizaram o método RAPD para tipificação de 13 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de salmão e truta prontos para o consumo em Osaka, Japão, identificando cinco diferentes genotípias. Os resultados indicaram ainda que cepas semelhantes foram identificadas em alimentos originários do mesmo produtor, independentemente do tipo de produto e da data de produção, o que sugere contaminação ambiental nas plantas de processamento analisadas.

Aguado e col. 2004, utilizando RAPD avaliaram a incidência de 1,21% de *L. monocytogenes* em 906 amostras de vegetais congelados e 1,2% em 166 amostras de superfícies de uma planta de processamento. Com base nos resultados, concluíram que os riscos de veiculação de *L. monocytogenes* em vegetais congelados é baixa, entretanto, a incidência de 8,49 e 6,62% de *L. innocua* em alimentos e superfícies, respectivamente, indica a possibilidade de contaminação cruzada durante o processamento dos alimentos.

Wagner & Allerberger 2003 defendem que o RAPD é útil quando há uma boa quantidade de células contaminantes e de mesma procedência de contaminação, como uma mesma planta de processamento. Demonstraram, ainda, que a limitação da técnica clássica de sorotipagem deve-se ao inexplicável fato de que o sorotipo mais freqüentemente associado à patogenia é o 4b e aqueles encontrados no alimento e no ambiente são os 1 / 2 a e 1 / 2 b, respectivamente 61% e 70% em seu estudo de amostras clínicas e alimentos e ambiente.

Martinez e col. 2003 com o emprego de RAPD, utilizando quatro diferentes iniciadores, pesquisaram 432 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras clínicas de pacientes e animais com listeriose, laticínios, vegetais, carnes, pescados amostras ambientais, plantas de processamento de aves e processamento de salmão. O resultado demonstra uma grande variabilidade genética das cepas pesquisadas, não permitindo uma relação entre as cepas provenientes das diversas fontes pesquisadas.

Vogel e col. 2001 utilizaram o método RAPD na pesquisa de 148 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras de salmão defumado embalado a vácuo, provenientes de dez diferentes plantas de processamento da Dinamarca. Como resultados encontraram 16 diferentes genotípias a partir de quatro iniciadores utilizados. Cepas semelhantes foram encontradas em produtos provenientes de diferentes plantas de processamento, o que pode indicar clones da mesma cepa, amplamente disseminada pela natureza. Outro resultado evidenciou semelhança genética entre cepas originárias de lotes de salmão defumado, produzidos em diferentes períodos de tempo. Os autores sugerem a possibilidade de contaminação ambiental persistente nas áreas de processamento estudadas. Embora considerem o método RAPD altamente discriminatório, rápido e reprodutível, os autores recomendam o emprego de vários métodos de pesquisa, a fim de estabelecer resultados mais precisos.

Silva e col. 2001 analisaram 32 cepas de *L. monocytogenes* provenientes de queijos comercializados no Rio de Janeiro, Brasil, utilizando o método RAPD. Foram identificadas características geneticamente semelhantes entre

cepas de sorotipagem diferente, isoladas de produtos de diferentes origens. Os autores atribuem as possíveis causas dos resultados à ocorrência de contaminação de matéria-prima pelo clone da cepa tipificada, associada a falhas no processo de pasteurização.

Byun e col. 2001 utilizaram RAPD para o estudo epidemiológico de isolados de *L. monocytogenes* provenientes de 54 amostras de diferentes tipos e origem de carnes. Os resultados identificaram semelhança genética entre carne bovina da Coréia e EUA e entre carne suína da Coréia e Dinamarca. Os autores classificaram o método RAPD bastante específico, fácil e bastante reprodutível, não apenas para *L. monocytogenes*, como para outras bactérias.

Destro 1996 empregou o método RAPD para análise de polimorfismo do DNA com dois iniciadores de sequência aleatória, em 115 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de camarão, utensílios e ambiente de uma planta de processamento de camarão congelado em Santos, São Paulo. O estudo demonstrou que o perfil de DNA das áreas de recepção de matéria prima era distinto do perfil das demais áreas, sugerindo um tipo de contaminação originária da matéria-prima e outro de contaminação persistente nas áreas de produção. Concluiu que o método empregado mostrou-se útil para a tipagem, visto que foram obtidos polimorfismos do DNA diferenciáveis e reprodutíveis.

1.7.2.2 – Amplificação de grupos repetitivos

Existem elementos do DNA na natureza que são repetitivos e encontrados na grande maioria de bactérias e são utilizados como iniciadores para amplificação do mesmo fragmento a partir do DNA genômico da bactéria estudada.

ERIC

O ERIC (Enterobacteria repetitive intergenic consensus), denominação de seqüências intergênicas repetitivas unânimes em enterobactérias específicas compostas de cento e vinte e quatro a cento e vinte e sete pares de bases que podem ser usadas como iniciadores para obter uma diferenciação genética (Matté 2003).

Nakamura e col. 2004 utilizaram o método ERIC-PCR para tipificação de 13 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de salmão e truta prontos para o consumo em Osaka, Japão, identificando cinco diferentes genotipias. Os resultados indicaram ainda que cepas semelhantes foram identificadas em alimentos originários do mesmo produtor, independentemente do tipo de produto e da data de produção, o que sugere contaminação ambiental nas plantas de processamento analisadas.

REP

REP (Repetitive extragenic palindromic sequence), denominação de seqüências polidrômicas repetitivas extragênicas, compostas de trinta e cinco a quarenta pares de bases, e ainda seqüências chamadas BOX, como cento e cinqüenta e quatro pares de bases e que apresentam três sub-unidades (Box A, Box B, Box C), que parecem estar localizadas em regiões intergênicas distintas ao redor do genoma (Matté 2003). Após amplificação, as bandas geradas são separadas por eletroforese em gel de agarose, que fornece um perfil de padrão complexo o qual lembra um código de barras que funciona como uma impressão digital para uma cepa bacteriana específica (Matté 2003).

Nakamura e col. 2004 utilizaram o método REP-PCR para tipificação de 13 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de salmão e truta prontos para o consumo em Osaka, Japão, identificando cinco diferentes genotípias. Os resultados indicaram ainda que cepas semelhantes foram identificadas em alimentos originários do mesmo produtor, independentemente do tipo de produto e da data de produção, o que sugere contaminação ambiental nas plantas de processamento analisadas.

REA

Aguado e col. 2004 utilizaram a técnica REA em amostras planta de processamento de vegetais, identificando contaminação cruzada pela prevalência de *Listeria spp.* Os autores fazem a ressalva que o baixo número de isolados dificultou a análise epidemiológica.

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Com base nos aspectos considerados, pesquisou-se o perfil genotípico de cepas de *L. monocytogenes* provenientes de carnes, mediante tipificação utilizando métodos moleculares.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 - confirmar a espécie *monocytogenes* de 31 cepas isoladas de carnes suína, bovina, aves e derivados de origem animal, através de PCR com iniciadores específicos para identificação dos genes 16S rRNA e Internalina A e B.

2.2.2 – avaliar a diversidade genotípica das cepas estudadas, com o emprego do método PFGE.

2.2.3 - relacionar os perfis das amostras e discutir a importância dos achados para a saúde pública.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - OBTENÇÃO DAS CEPAS

O total de 38 cepas de *L. monocytogenes*, originárias da coleção de cultura do Laboratório de Saúde Pública do Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, sendo 31 provenientes de diversos cortes de carne bovina, suína e aves e 7 cepas controle, sendo uma de amostra de frango e 6 amostras clínicas de seres humanos, foram analisadas pelas técnicas moleculares de PCR, com confirmação da espécie pelos genes 16S rRNA e Internalina e analisada a diversidade genotípica das cepas de *L. monocytogenes* confirmadas com o emprego da técnica PFGE.

As cepas controle são provenientes de banco de cepas de referência do Instituto Adolpho Lutz e foram utilizadas com a finalidade de servir de referência para a análise comparativa entre o perfil genotípico destas, classificadas comprovadamente *L. monocytogenes* e das demais cepas estudadas.

A utilização da cepa controle ATCC 19111, isolada em 1940, teve o objetivo de observar o potencial da técnica de PFGE para distinção genética entre as cepas de amostras de alimentos estudados, comparativamente com origem geográfica, idade cronológica e outros fatores.

Quadro 01 - Identificação e origem das cepas de *Listeria* utilizadas no presente estudo.

Identificação	Identificação original	Origem
116/05	<i>L. monocytogenes</i>	Carne moída – bovina
117/05	<i>L. monocytogenes</i>	Moela de frango
118/05	<i>L. monocytogenes</i>	Corte temperado de peru
119/05	<i>L. monocytogenes</i>	Frango resfriado
120/05	<i>L. monocytogenes</i>	Carne mecanicamente separada – frango
121/05	<i>L. monocytogenes</i>	Steak de frango
122/05	<i>L. monocytogenes</i>	Carne bovina processada
123/05	<i>L. monocytogenes</i>	Coxa – peru
124/05	<i>L. monocytogenes</i>	Coxa resfriada – frango
126/05	<i>L. monocytogenes</i>	Salsicha – hot dog
127/05	<i>L. monocytogenes</i>	Peito de peru sem osso sem pele
128/05	<i>L. monocytogenes</i>	Bisteca
129/05	<i>L. monocytogenes</i>	Lingüiça toscana
130/05	<i>L. monocytogenes</i>	Carne sem osso resfriada – bovina
131/05	<i>L. monocytogenes</i>	Sobrecoxa de frango
132/05	<i>L. monocytogenes</i>	Peito de frango
133/05	<i>L. monocytogenes</i>	Sobrecoxa de peru
134/05	<i>L. monocytogenes</i>	Meio peito de peru
135/05	<i>L. monocytogenes</i>	Meio peito de peru
136/05	<i>L. monocytogenes</i>	Carne moída – bovina
137/05	<i>L. monocytogenes</i>	Carcaça de frango – congelado
138/05	<i>L. monocytogenes</i>	Frango – congelado
139/05	<i>L. monocytogenes</i>	Coxa sem osso
140/05	<i>L. monocytogenes</i>	Carcaça de frango temperada
141/05	<i>L. monocytogenes</i>	Corte de peru temperado e congelado
142/05	<i>L. monocytogenes</i>	Carne moída – bovina
143/05	<i>L. monocytogenes</i>	Corte de frango congelado
144/05	<i>L. monocytogenes</i>	Frango congelado
145/05	<i>L. monocytogenes</i>	Peito de frango
146/05	<i>L. monocytogenes</i>	Coxa e sobrecoxa sem osso
147/05	<i>L. monocytogenes</i>	Asa interfolhada
365/05	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC19111 – frango
369/05	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC19115
370/05	<i>L. monocytogenes</i>	IAL0633 sem informação
373/05	<i>L. monocytogenes</i>	IAL1979 – sem informação
374/05	<i>L. monocytogenes</i>	IAL 1980 – humano
376/05	<i>L. monocytogenes</i>	IAL 1982 – humano
377/05	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 7644 – humano

Legenda: IAL Instituto Adolpho Lutz; ATCC: American Type culture Collection, EUA

3.2 – CONFIRMAÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* UTILIZANDO PCR

3.2.1 – Extração do DNA Genômico

Para extração dos organismos foi utilizada a metodologia descrita por Matté e col. 2005, com a utilização de fenol clorofórmio conforme descrito a seguir.

As cepas foram cultivadas em Caldo Frazier a 35°C por 24 horas. Após o período de incubação, 1,5 mililitros de cada amostra foi centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos, e os sobrenadantes foram descartados.

O sedimento limpo foi ressuspenso em 100 µL de tampão TE I e 100 µL de solução 10mg/mL de Lisozima. Após homogeneização as amostras foram incubadas por 10 minutos a 37°C.

Em seguida 500 µL da solução de lise contendo β – mercaptoetanol [50µL de 100mM Tris-HCL (pH 8.0) + 50 µL 50mM EDTA (pH 8.0) + 50 µLSDS 10% + 3,5 µL 70 mM β-mercaptoetanol + 346,5 µL de água Milli-Q], foram adicionados a cada microtubo contendo as cepas de *Listeria* em estudo e incubado em banho-maria a 65°C por 15 minutos. Após o período de incubação inicial, foram acrescentados 20 µL de Proteinase K, e novamente incubados em banho-maria a 65°C por 15 min. adicionais.

Após a lise as amostras foram mantidas em temperatura ambiente, até a equalização da temperatura e a cada tubo foram acrescentados 500 µL da solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). Os tubos foram

vigorosamente agitados e centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos. Com o auxílio de pipeta automática, a fase aquosa, cerca de 400µL, foi transferida para novos tubos, devidamente identificados os quais foram submetidos a uma nova extração com 500 µL de clorofórmio puro, centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi novamente transferida para novos tubos.

A precipitação do material genético foi realizado pelo acréscimo de 500 µL de isopropanol gelado. Cada microtubo foi homogeneizado cuidadosamente por inversão e centrifugado a 12000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e 500 µL de etanol a 70% gelado foi acrescentado a cada microtubo, os quais foram centrifugados a 12000 rpm por 3 minutos. Descartados os sobrenadantes, os tubos foram secados sob vácuo. Os DNAs foram eluídos com 50 µL do tampão TEII e armazenados a 4°C até o momento de serem utilizados na amplificação pela reação em cadeia pela polimerase.

3.2.2 - Confirmação da Espécie por PCR

O DNA genômico de cada cepa em estudo foi utilizado na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), com uso de iniciadores específicos, conforme descrito na Tabela 1, para confirmação da posição taxonômica das cepas estudadas, utilizando os indicadores correspondentes às regiões específicas dos genes 16S rRNA, para o gênero *Listeria* e especificamente *L. monocytogenes*, descrito por Somer & Kashi 2003.

TABELA 1 - Sequência dos iniciadores empregados para a identificação do gene 16S rRNA do PCR

INICIADOR	ESPÉCIE	SEQUENCIA
89	<i>L. ivanovii</i>	5'- AGCTTGCTCTTCCAATGT-3'
90	<i>L. grayi</i> , <i>L. murrayi</i>	5'- GCTTGCTCCTTTGGTCG-3'
91	<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innnocua</i> , <i>L. seeligeri</i> , <i>L. welshimeri</i>	5'-AGCTTGCTCTTCCAAAGT-3
92	<i>L. monocytogenes</i> sequence, variant B	5'-GCTAATACCGAATGATAAGA-3'
93	<i>L. monocytogenes</i> sequence variant B	5'-GGCTAATACCGAATGATgAA-3'
94	<i>Listeria sp</i>	5'-AAGCAGTTACTCTTATCCT-3'

IAL Instituto Adolpho Lutz; ATCC: American Type Culture Collection, EUA

O PCR foi realizado em uma solução contendo 5 µL de DNA (250µg), tampão de reação 1X, 1,5 mM MgCl, 200µM Dntp, 0,5 µM de cada iniciador direto e 1 µM do iniciador reverso, 1,25U *Taq* polimerase e água *MilliQ* estéril para uma reação de 25µL. Os parâmetros do ciclo para amplificação foram: 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 51°C por 45 segundos, e 72°C por 1 minuto; e ainda, uma extensão final a 72° C por 7 minutos. Para visualização das bandas, o *amplicon* obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% (GE) com intensidade de 6 V/cm por 1 hora. Ao final, o gel de agarose foi visualizado por coloração com Brometo de Etílio. A imagem foi capturada através do sistema de aquisição de imagens EPI Chemi II Darkroom (UVP) e software Labworks (UVP). A determinação do peso molecular dos

fragmentos obtidos foi realizada pela comparação com peso molecular 100 bp Ladder.

A presença do fragmento com cerca de 300 pares de base, ampliada pelos iniciadores 91 e 92, ou 93, demonstra a presença de *L. monocytogenes*. A presença de apenas um fragmento com cerca de 400 pares de base, representa a presença de espécie diferente da *L. monocytogenes*, como demonstrado na Figura 1. A ausência de bandas representa a presença de outro organismo, que não *Listeria*.

3.2.3 – PCR para Confirmação da Presença do Gene Internalina AB

O DNA genômico de cada cepa em estudo foi utilizado na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), com uso de iniciadores específicos, conforme descrito na Tabela 2, para confirmação da espécie *L.monocytogenes*, utilizando os indicadores correspondentes a regiões específicas dos genes Internalina AB, conforme descrito por Jung e col. 2003.

TABELA 2 Sequência dos iniciadores específicos para identificação dos genes Internalina A e B.

INICIADOR	SEQUENCIA 5'a 3'	POSIÇÃO
96	CTTCAGGCGGATAGATTAGG	332-351
97	TTCGCAAGTGAGCTTACGTC	1214-1233C

IAL – Intituto Adolpho Lutz; ATCC: American Type Culture Collection, EUA

O PCR foi realizado em uma solução contendo 5 µL de DNA (250µg), tampão de reação 1X, 1,5 mM MgCl, 200µM Dntp, 0,5 µM de cada iniciador direto e 0,5 uL de cada iniciador 1,25U *Taq* polimerase e água *MilliQ* estéril para uma reação de 25µL. Os parâmetros do ciclo para amplificação foram: 94°C por 3 minutos; 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 51°C por 1 minuto, d) 72°C por 1 minuto e ainda, uma extensão final a 72° C por 7 minutos. Para visualização das bandas, o *amplicon* obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% (GE) com intensidade de 6 V/cm por 1 hora. Ao final, o gel de agarose foi visualizado por coloração com Brometo de Etilio. A imagem foi capturada através do sistema de aquisição de imagens EPI Chemi II Darkroom (UVP) e *software* Labworks (UVP).

A determinação do peso molecular dos fragmentos obtidos foi realizada pela comparação com peso molecular 1Kb DNA Ladder. A presença de fragmentos de cerca de 902 bp indica a bactéria *L. monocytogenes*.

Os equipamentos utilizados nos testes utilizando o PCR foram: centrífuga Eppendorf ® Centrifuge 5804R (refrigerado), empregando os rotores F34-6-38 (para tubos Falcon) e F45-30-11 (para tubos Eppendorf); aparelho de PCR Eppendorf Mastercycler® e biofotômetro Eppendorf Biophotometer®.

3.2.4 – Eletroforese Em Campo Pulsado (PFGE)

Foi desenvolvida a técnica de PFGE para determinação do perfil genotípico das cepas de *L. monocytogenes*, que foram anteriormente confirmadas pelas técnicas de PCR, segundo o protocolo proposto pelo CDC (Centers of Disease Control/ EUA), descrito a seguir:

a) Preparação da Cultura das Cepas

As células foram cultivadas a 37° C por cerca de 18 horas, em placas de Brain Heart Infusion Agar (BHIA). A seguir foram transferidas para tubo Falcon 2057 (14 mL – 17 x 100 mm), contendo 3 mL de solução de TE. Foi ajustada a densidade ótica da bactéria em suspensão para 1,3 a 610 nm com o mesmo tampão, com o uso do espectofotômetro .

Foram transferidos 240 µL de cada solução de bactéria para microtubos de polipropileno, tipo *Ependorf* devidamente identificados, aos quais foram adicionados de 60 µL de solução de lisozima (10 mg/mL), homogeneizados e a seguir incubados em banho-maria a 37° por 10 minutos.

b) Preparação do SSP - 1,2% Agarose para plug; 1% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS): 0,2 mg/mL proteinase K.

A solução SSP foi preparada de acordo com a seguinte proporção para cada cepa: 30 µL de SDS; 267 µL de Agarose para *plug* (Bio-Rad) a 1,2% e 3

μ l de proteinase K a 20 mg/mL. A solução foi mantida aquecida em banho-maria, com temperatura entre 53 a 56° C.

c) Preparação do *PLUG*

A preparação do *plug* contou com o desenvolvimento do seguinte procedimento:

Trezentos microlitros da suspensão de células em lisozima, foram adicionados de 300 μ L de solução SSP aquecida de 53 a 56° C, homogeneizados com e imediatamente dispensados nos moldes para *plugs*. A solidificação foi realizada à temperatura ambiente por 15 minutos.

d) Preparação da Lise

O tampão de lises foi preparado utilizando-se a seguinte proporção: para cada amostra 4 mL de solução 50 mM Tris pH 8,0; 50 mM EDTA, pH 8,0; 1% Sarkosyl e 30 μ L de proteinase K a 20 mg/mL.

Os *plugs* de cada amostra foram transferidos para cada Tubo tipo *Falcon* devidamente identificados e contendo 4 mL do tampão de lises. Em seguida foram incubados por 2 horas em banho-maria a 54 °C (+/- 1° C).

e) Enxágüe

Os *plugs* foram enxaguados por duas vezes em 15 mL de água MilliQ esterilizada (pré - aquecida entre 50 a 54° C), com constante movimentação. Em seguida, foram enxaguados por 4 vezes com 15 mL de TE, pH 8,0

(previamente aquecido entre 50 a 54° C), por 15 minutos em enxágüe com constante aquecimento. Após o último enxágüe o TE buffer foi decantado e 5 mL de TE, pH 8,0 (em temperatura ambiente) foram adicionados em cada tubo. Porções de cerca de 2 mm de cada *plug*, foram imediatamente digeridas com enzima específica *Apa* I.

f) Digestão por enzima de restrição *Apa* I do DNA da *L. monocytogenes* em *plugs* de agarose

Para cada cepa analisada foram utilizados os seguintes volumes de reagentes: 135 µl de água MilliQ esterilizada e 15 µl de tampão 1x de reação (fornecida pelo fabricante). Posteriormente a solução foi transferida para microtubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados os *plugs* (removidos do TE).

Os tubos contendo as porções de *plug* imersos em Tampão de reação, foram mantidos em banho-maria a 37° C por 10 a 15 minutos. Ao mesmo tempo, foi preparada a mistura de enzima na seguinte proporção para cada cepa estudada: 132,5 µl de água esterilizada; 15 µl de tampão 1x e 2,5 µl de enzima *Apa* I (10U/ul).

Após remoção do tampão inicial, foram adicionados 150 µl de solução contendo a enzima de restrição em cada tubo. Após fechados e homogeneizados, os tubos foram incubados em banho-maria, em temperatura de 37° C, por cerca de 18 horas.

g) Separação dos fragmentos por Eletroforese em Campo Pulsado

Os *plug* digeridos foram submetidos a uma Eletroforese em Campo pulsado em gel de agarose 1% por um período de 27 horas em tampão TBE 0,5x em temperatura de 14°C. Os pulsos foram estipulados em: início de 4" e tempo final de 40" e o programa foi desenvolvido em aparelho Mapper Bio-Rad®.

h) análise de similaridade pelo coeficiente de Pearson

Ao final, o gel de agarose foi visualizado por coloração com Brometo de Etílio. A imagem foi capturada através do sistema de aquisição de imagens EPI Chemi II Darkroom® (UVP) e software Labworks® (UVP).

A determinação do peso molecular dos fragmentos obtidos foi realizada pela comparação com marcador de alto peso molecular Ladder DNA com intervalos de 48,5 Kb.

A análise dos perfis obtidos foi realizada com auxílio do *software* específico desenvolvido para a comparação do padrão de bandas, usando coeficiente de Pearson (GelWorks 1D Advanced® UVP, versão 4.01). Os perfis encontrados foram graficamente demonstrados por um dendrograma (Figuras 4, 5 e 6).

Os equipamentos utilizados para o emprego da técnica PFGE foram: sistema de eletroforese Bio Rad Chef Mapper® XA Pulsed Field.

4 – RESULTADOS

4.1 – EXTRAÇÃO DO DNA

Foram extraídos os DNAs das 38 cepas de *L.monocytogenes* utilizando o método descrito por Matté e col., 2005. A concentração e qualidade do DNA obtidos foram avaliados por espectrometria e por eletroforese em gel de agarose.

4.2 – CONFIRMAÇÃO DA ESPÉCIE POR PCR

4.2.1 – Confirmação da Taxonomia pela Presença dos Genes 16S rRNA e Internalina

O DNA genômico das cepas em estudo foi utilizado na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), para confirmação da espécie *L. monocytogenes*, utilizando os iniciadores correspondentes a regiões específicas dos genes 16S rRNA, descrito por Somer & Kashi 2003, identificando o gênero e várias espécies e também as regiões correspondentes dos genes Internalina A e B, descrito por Jung e col. 2003.

Foram triadas 38 cepas, dentre as quais 20 das cepas estudadas e 7 do grupo controle confirmaram a espécie *L. monocytogenes*, totalizando 27 cepas

confirmadas. Duas cepas do grupo estudado foram identificadas como *Listeria spp*; quatro apresentaram resultado negativo e cinco cepas não apresentaram resultados conclusivos e requerem estudos posteriores, mas não foram identificadas como *L. monocytogenes*. Os resultados são apresentados no quadro 2. As figuras 1, 2 e 3 apresentam os resultados obtidos para confirmação de espécie pela técnica PCR dos genes 16S rRNA e Internalina A e B.

Quadro 2 – Resultados da confirmação de espécie *L. monocytogenes* pelas técnicas de PCR – 16S rRNA e genes Internalina AB das cepas analisadas

Identificação	Identificação original	Origem	Confirmação por PCR
1 - 116/05	<i>L. monocytogenes</i>	Carne moída – bovina	Confirmado
2 - 117/05	<i>L. monocytogenes</i>	Moela de frango	Confirmado
3 - 118/05	<i>L. monocytogenes</i>	Corte temperado de peru	Confirmado
4 - 119/05	<i>L. monocytogenes</i>	Frango resfriado	Listeria sp
5 - 120/05	<i>L. monocytogenes</i>	Carne mecanicamente separada – frango	Negativo
6 - 121/05	<i>L. monocytogenes</i>	Steak de frango	Confirmado
7 - 122/05	<i>L. monocytogenes</i>	Carne bovina processada	Negativo
8 - 123/05	<i>L. monocytogenes</i>	Coxa – peru	Confirmado
9 - 124/05	<i>L. monocytogenes</i>	Coxa resfriada – frango	Negativo
10 - 126/05	<i>L. monocytogenes</i>	Salsicha – hot dog	Confirmado
11 - 127/05	<i>L. monocytogenes</i>	Peito de peru sem osso sem pele	Confirmado
12 - 128/05	<i>L. monocytogenes</i>	Bisteca	Listeria sp
13 - 129/05	<i>L. monocytogenes</i>	Lingüiça toscana	Confirmado
14 - 130/05	<i>L. monocytogenes</i>	Carne sem osso resfriada – bovina	Confirmado
15 - 131/05	<i>L. monocytogenes</i>	Sobrecoxa de frango	Confirmado
16 - 132/05	<i>L. monocytogenes</i>	Peito de frango	Confirmado
17 - 133/05	<i>L. monocytogenes</i>	Sobrecoxa de peru	Não conclusivo
18 - 134/05	<i>L. monocytogenes</i>	Meio peito de peru	Não conclusivo
19 - 135/05	<i>L. monocytogenes</i>	Meio peito de peru	Negativo
20 - 136/05	<i>L. monocytogenes</i>	Carne moída – bovina	Confirmado
21 - 137/05	<i>L. monocytogenes</i>	Carcaça de frango – congelado	Confirmado
22 - 138/05	<i>L. monocytogenes</i>	Frango – congelado	Confirmado
23 - 139/05	<i>L. monocytogenes</i>	Coxa sem osso	Não conclusivo
24 - 140/05	<i>L. monocytogenes</i>	Carcaça de frango temperada	Confirmado
25 - 141/05	<i>L. monocytogenes</i>	Corte de peru temperado e congelado	Confirmado
26 - 142/05	<i>L. monocytogenes</i>	Carne moída – bovina	Não conclusivo
27 - 143/05	<i>L. monocytogenes</i>	Corte de frango congelado	Não conclusivo
28 - 144/05	<i>L. monocytogenes</i>	Frango congelado	Confirmado
29 - 145/05	<i>L. monocytogenes</i>	Peito de frango	Confirmado
30 - 146/05	<i>L. monocytogenes</i>	Coxa e sobrecoxa sem osso	Confirmado
31 - 147/05	<i>L. monocytogenes</i>	Asa interfolhada	Confirmado
365/05	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC19111	Confirmado
369/05	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC19115	Confirmado
370/05	<i>L. monocytogenes</i>	IAL0633	Confirmado
373/05	<i>L. monocytogenes</i>	IAL1979	Confirmado
374/05	<i>L. monocytogenes</i>	IAL 1980	Confirmado
376/05	<i>L. monocytogenes</i>	IAL 1982	Confirmado
377/05	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 7644	Confirmado

IAL Instituto Adolpho Lutz; ATCC: American Type culture Collection, EUA

Figura 1 - Gel de agarose apresentando possíveis reações para a confirmação do gênero *Listeria* pela amplificação com iniciadores desenhados com base no fragmento 16S do DNA ribossômico. M= 100 bp ladder; 1= controle positivo *Listeria monocytogenes* ATCC; 2,3,4= amostras positivas *Listeria monocytogenes*; 5= amostra confirmada como *Listeria* sp.; 6= não *Listeria*.

Figura 2 - Gel de agarose apresentando reações positivas e negativas para a confirmação de *Listeria monocytogenes* utilizados no presente estudo pela amplificação com iniciadores desenhados com base no fragmento 16S do DNA ribossômico.

Figura 3 - Gel de Agarose contendo os fragmentos amplificados com iniciadores específicos para Internalina AB de *Listeria monocytogenes*.

4.3 – PFGE

Foram analisadas pela técnica PFGE as 27 cepas de *L. monocytogenes*, sendo 20 cepas de alimentos e sete cepas controle, que foram confirmadas pela presença dos genes 16S rRNA e Internalina AB, através do emprego da técnica de reação em cadeia de polimerase - PCR, conforme resultado apresentado no Quadro 2.

O estudo de diversidade empregando a digestão com enzima de restrição *ApaI* demonstrou diversos fragmentos com peso molecular variando entre 48,5 e 582,0 kb.

A partir dos resultados de peso molecular dos fragmentos analisados, foi realizada análise da diversidade das cepas, através do coeficiente de similaridade de Pearson, cujos resultados são apresentados nas figuras 4, 5 e 6 e descritos detalhadamente a seguir nos itens 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3 deste trabalho.

4.3.1 – Análise de Similaridade das Cepas de Alimentos Estudadas

Na figura 4 pode ser observada a diversidade genética das cepas de alimentos estudadas, com variabilidade genética resultando entre 81 a 100% de similaridade.

A Figura 4 apresenta um agrupamento com sete cepas (141/05; 147/05; 138/05; 144/05; 146/05; 140/05 e 145/05) todas provenientes de amostras de

frango, exceto uma (141/05), proveniente de amostra de corte de peru temperado e congelado.

Foram identificados dois pares de cepas com perfis de restrição idênticos, representando clonalidade microbiológica (cepas 116/05 e 117/05 e 123/05 e 118/05).

As cepas 116/05 e 117/05 apresentaram clonalidade microbiológica, embora não sejam originárias do mesmo tipo de alimento (carne bovina moída e moela de frango, respectivamente).

Juntamente com as cepas provenientes dos alimentos foi analisada a cepa controle de origem de coleção de culturas código ATCC 19111, proveniente de amostra de frango, originária da Inglaterra, descrita inicialmente por Paterson, em 1940. A cepa controle ATCC 19111 ao ser avaliada em conjunto com as cepas do estudo, foi posicionada no grupo externo ao estudado, por apresentar características genéticas diversas das demais.

Na Figura 4 foi observado ainda um grupamento de 10 cepas (121/05; 137/05; 123/05; 118/05; 130/05; 136/05; 132/05; 131/05; 126/05 e 127/05), destas, as cepas 123/05 e 118/05 apresentaram clonalidade microbiológica, por apresentarem o mesmo perfil genotípico e são originárias de amostras do mesmo tipo de alimento, apesar de cortes diferentes (corte temperado de peru e coxa de peru, respectivamente). As cepas 130/05 e 136/05 apresentaram semelhança genética e ambas provém do isolamento de cortes de carne bovina (carne sem osso resfriada bovina e carne moída).

No geral, foi observada uma grande variabilidade genética representada praticamente em todos os tipos de alimentos, temperaturas, cortes empregados e presença de temperos. A partir desse observado, aparentemente não foi estabelecida correlação entre os perfis genotípicos e as condições de temperatura, se congeladas ou refrigeradas; tipo de corte, se fatiados, picados ou e carcaça e adição de temperos, se presente ou não.

4.3.2 – Análise de Similaridade das Cepas Controle

A figura 5 demonstra a diversidade das cepas do grupo controle, com variabilidade genética resultando entre 84 a 100%.

Dentre as sete cepas analisadas foram observados dois agrupamentos, sendo encontrado um par que apresentou clonalidade microbiológica (cepas IAL 1982 e ATCC 7644). No mesmo grupo, mas com menor semelhança genética foi agrupada a cepa ATCC 19115. Todas as três cepas são originárias de amostras clínicas de humanos.

A grande variabilidade genética encontrada nas análises conduzidas pela técnica de PFGE confirma a diversidade existente inclusive entre as cepas originárias de amostras de mesmos substratos, como pode ser observado pela cepa IAL 1980 que foi classificada de forma distante das demais, mesmo sendo originária de amostras clínicas. O mesmo não foi observado no caso das cepas ATCC 19115 e IAL 1982, que foram agrupadas com proximidade no mesmo grupo de similaridade.

A Figura 5 demonstra ainda um agrupamento de duas cepas IAL 0633 e IAL 1979, cuja origem não foi fornecida, que embora não sejam clones microbiológicos, apresentam grande semelhança entre si, mas menor semelhança com o restante das cepas controle. Estas mesmas cepas quando analisadas juntamente com o grupo de alimentos foram agrupadas dentro do grupo de estudo como será discutido no tópico seguinte.

4.3.3 – Análise de Similaridade do Total de Cepas Estudadas e Controle

Com base na análise da figura 6, foram observados 18 perfis de restrição diferentes, sendo que em duas situações foram encontrados perfis de clonalidade microbiológica (116/05 e 117/05). A variabilidade genética variou entre 84 e 100%.

Quando comparadas às cepas de alimentos analisadas com as do grupo controle fica demonstrado a separação em dois grupos bem distintos. Foi observado que, mesmo quando a cepa é procedente de alimentos, como o caso da cepa ATCC 19111, o fato não é condição suficiente para que seja agrupada com demais cepas de alimentos, como já demonstrado no item 4.3.1 deste trabalho.

A Figura 6 demonstrou ainda que as cepas IAL 0633 e IAL 1979 foram agrupadas com o grupo de estudo, que embora não apresentem clonalidade microbiológica entre si, apresentam certa similaridade com as cepas de alimento analisadas no presente estudo.

Figura 4. Representação gráfica da matriz de similaridade de Pearson, obtido pela técnica de Eletroforese em Campo Pulsado do DNA genômico, de cepas *Listeria monocytogenes* isoladas de diferentes amostras de alimento.

Figura 5. Representação gráfica da matriz de similaridade de Pearson, obtido pela técnica de Eletroforese em Campo Pulsado do DNA genômico, de cepas *Listeria monocytogenes* utilizadas como controle.

Figura 6. Representação gráfica da matriz de similaridade de Pearson, obtido pela técnica de Eletroforese em Campo Pulsado do DNA genômico, de cepas *Listeria monocytogenes* isoladas de diferentes amostras de alimento e amostras de origem diérsa.

5 - DISCUSSÃO

A identificação rápida, simplificada e específica de agentes patogênicos representa um dos maiores desafios atuais para as vigilâncias epidemiológica e sanitária de países do mundo todo.

Tradicionalmente a identificação da espécie *L. monocytogenes* é feita a partir de testes fenotípicos, imprescindíveis à conservação e multiplicação dos agentes e classificação sorotípica da espécie.

Contudo, diversas limitações, como a baixa especificidade; as dificuldades encontradas no isolamento; a demora para obtenção dos resultados; as grandes chances de erro nas fases de isolamento e interpretação e a exigência de recursos humanos especializados, dentre outros, são razões que justificam o desenvolvimento de testes mais sensíveis e rápidos, como as técnicas moleculares. A alta especificidade e capacidade de reproduzibilidade das técnicas genotípicas promove resultados mais precisos e rápidos, favorecendo o diagnóstico de surtos.

5.1 – CONFIRMAÇÃO DA ESPÉCIE POR PCR

5.1.1 – Resultados Moleculares não Confirmaram a Identificação da Análise Microbiológica Convencional

No presente trabalho foi constatado que 11 das 31 cepas supostamente identificadas como *L. monocytogenes* por métodos fenotípicos não foram confirmadas pelo método PCR de identificação dos genes 16S rRNA e Internalina A e B. Das 31 cepas avaliadas duas (6%), foram identificadas como *Listeria* sp; quatro (13%), não puderam ser identificadas como *L. monocytogenes*. Outras cinco (16%) não apresentaram resultados conclusivos, exigindo análises complementares. O resultado representa 35% de diagnóstico incorreto de *L. monocytogenes* obtido por métodos fenotípicos. Outros autores também apresentam discordância entre resultados de métodos fenotípicos, quando comparados aos moleculares, possibilitando o questionamento sobre a precisão dos indicadores de prevalência desse importante patógeno.

Hofer e col. 2000, realizaram testes fenotípicos em 3532 cepas identificadas inicialmente como *Listeria*, isoladas durante o período de 1971 a 1997 provenientes de várias fontes, como alimentos, clínica e ambiente, originárias de várias regiões do Brasil. Os autores avaliaram que apenas 82% do total de 3532 cepas foram confirmadas morfológica e bioquimicamente como espécies de *Listeria*. Mesmo não utilizando métodos moleculares, o estudo demonstrou a existência de grandes riscos de avaliação incorreta a partir de exames fenotípicos. Os autores destacam ainda a possibilidade de erro na interpretação dos exames bacterioscópicos no momento de seleção das culturas, ou ao descuido durante a aplicação e leitura de resultados de hemólise durante o emprego da metodologia descrita por Rocourt e col. em 1983.

Em consonância com os resultados do presente estudo, no qual cepas identificadas como *L. monocytogenes* não foram confirmadas pelo método PCR, Rijpens e col. 1998, analisando 4 cepas identificadas por método fenotípico supostamente como *L. monocytogenes*, constataram que nenhuma confirmou ser o patógeno.

A adoção do método PCR para confirmação de espécie já é amplamente discutida no meio científico, mas ainda representa técnica pouco difundida nas práticas de controles de vigilâncias epidemiológica e sanitária adotados no Brasil. Considerando que a legislação no Brasil e em muitos países regulamenta a ausência da bactéria em 25 g de alimento, grande parte dos alimentos analisados pode estar sendo indevidamente incriminada. Em consonância com diversos trabalhos, o emprego das técnicas moleculares foi considerado bastante específico para a identificação da espécie *L. monocytogenes*, comprovando os resultados observados por vários autores (Jaradat e col. 2002; Jung e col. 2003; Grif e col. 2001; Alpas & Bozoglu 2003; Somer & Kashi 2003; Doumith and col. 2004; Boroucki & Call 2003).

5.1.2 – Discussão dos Resultados do PCR para Identificação do Gene 16S rRNA

A seleção do grupo de iniciadores para identificação do gene 16S rRNA descrito por SOMER e KASHI, 2002, utilizado no presente estudo teve como critério a vantagem de poder identificar tanto o gênero *Listeria spp*, bem como a

espécie *L. monocytogenes*, permitindo maior versatilidade na identificação dos isolados. Outra vantagem do grupo de iniciadores adotado é a de permitir a identificação das diferentes grupos de espécies de *Listeria*, quando empregados separadamente, o que não foi o caso deste trabalho. Não há registro na literatura da utilização deste grupo de iniciadores para especificação da *Listeria spp* e *L. monocytogenes* em outros estudos no Brasil.

Rijpens e col. 1998, analisaram pelo método PCR com identificação do gene 16S rRNA de 4 cepas identificadas supostamente como *L. monocytogenes*, isoladas de queijos na Bélgica, e constataram que nenhuma confirmou ser o patógeno, o que justificou a recomendação do uso de técnicas moleculares para a identificação mais precisa da bactéria.

5.1.3 – Discussão dos Resultados do PCR para Identificação dos Genes Internalina A e B

Os resultados encontrados na identificação do gene 16S rRNA do presente estudo foram confrontados com os encontrados pelos iniciadores específicos para identificação dos genes Internalina A e B. Foi encontrada concordância nos dois resultados, confirmando, portanto, que apenas 20 cepas de 31 estudadas são de fato *L. monocytogenes*. As quatro cepas de identificação 120/05; 122/05; 124/05 e 135/05 não confirmaram ser *L. monocytogenes*. Duas cepas (119/05 e 128/05) são *Listeria spp*. Outras cinco (133/05; 134/05; 139/05; 142/05 e 143/05) não foram confirmadas como

supostamente identificadas como *L.monocytogenes*, porque não apresentaram resultados conclusivos, em nenhum dos testes, exigindo estudos futuros. A adoção do iniciador descrito por Jung e col. 2003 foi baseada no critério de eficiência encontrado pelo autor e por ter sido aplicado para diferentes tipos de alimentos, semelhantemente ao presente estudo. A partir dos resultados encontrados e apresentados nas figuras 1, 2 e 3, confirmamos os resultados inicialmente encontrados com o emprego conjunto de iniciadores específicos para identificação do gene 16S rRNA.

Jaradat e col. 2002 pesquisaram 30 cepas originárias de amostras clínicas e de alimentos, provenientes de duas localidades, sem relação epidemiológica entre si utilizando a sorotipagem, PCR para identificação de genes Internalina A e B constataram que todas as cepas analisadas por fenotípi confirmaram a presença dos genes Internalina A e B. Embora existam relatos de polimorfismo (Ericsson e col. 1997), o mesmo não foi objeto deste estudo. Os autores justificam a importância do uso de técnicas moleculares pelo fato de que a classificação de sorotipos não discrimina a fonte, tipo de produto ou regionalidade, havendo o mesmo sorotipo freqüentemente para cada situação diferente. O contrário também é observado: cepas geneticamente diversas isoladas da mesma origem.

Giavannucci e col. 1999, empregaram o método PCR-REA para identificação dos genes Internalina A e B com o emprego da enzima *AluI*, a fim de identificar a presença de *L. monocytogenes* de cortes de suínos na França. Pesquisando 287 cepas provenientes de carne suína, equipamentos e ambiente

provenientes de cinco diferentes frigoríficos na França os autores encontraram dois perfis de polimorfismo dos genes Internalina A e B, em concordância com outros autores, o que também é observado quando identificada a presença de outros genes de virulência, como *hly*, *prfA*, *iap* e *mpl*, *ltrB*.

5.2 – DISCUSSÃO SOBRE OS RESULTADOS DA DIVERSIDADE PELO PFGE

O presente estudo teve como principal objetivo traçar o perfil genotípico, pelo emprego do método PFGE, de cepas de *L.monocytogenes* isoladas de diferentes tipos e cortes de alimentos, originários de coleção de culturas do Laboratório de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, conforme apresentados no Quadro 1. O trabalho optou pela técnica PFGE pelo alto poder discriminatório que a mesma possui, conforme concluem diversos autores (Kerouanton e col. 1998; Vogel e col. 2004; Leite e col. 2005).

O método utilizado foi prescrito pelo CDC Centers of Disease Control, Estados Unidos da América e foi utilizado com sucesso por Autio e col. 2004, para identificação de similaridade genotípica de *L. monocytogenes* em carne suína e planta de processamento de suínos.

Para uma análise mais diversificada foram acrescentadas sete cepas controle provenientes de coleção de cultura, conforme descrito no Quadro 1. Dessa forma, foram analisadas pela técnica PFGE as 27 cepas de *L. monocytogenes*, sendo 20 cepas de alimentos e sete cepas controle.

Os resultados dessa análise foram apresentados nas figuras 4, 5 e 6.

5.2.1 – Discussão da Análise de Similaridade das Cepas de Alimentos Estudados

Com base nos resultados apresentados na Figura 4, observou-se a variabilidade genética de 81 a 100%, destacando-se um agrupamento de 10 cepas com similaridade e a presença de um clone microbiológico.

O dendograma ilustrado na figura 4 demonstra ainda um outro agrupamento, que embora apresente um único par de clones microbiológicos (144/05 - frango congelado e 146/05 – coxa e sobrecoxa sem osso), possui grande similaridade entre sete cepas, todas provenientes de amostras de frango. Esse resultado condiz com o encontrado com Nakamura e col. 2004, analisando 13 cepas de *L. monocytogenes* em truta e salmão defumados em Osaka, Japão, com a utilização da técnica PFGE identificaram perfis semelhantes para cepas de mesma procedência, mesmo tendo sido coletadas em momentos diferentes, entre os anos de 1999 e 2000. Gilbreth e col. 2005, com o uso da técnica PFGE com a enzima *Ascl*, identificaram vários perfis genotípicos nos diferentes tipos de alimentos, mas observaram alguns perfis, inclusive de mesmo sorotipo, que apresentaram relação de similaridade com o tipo de alimento originário, como o caso de 18 isolados de saladas provenientes da Califórnia, que correspondem a um único perfil (neste caso, sorotipo 1/2 b) e 9 isolados de frutos do mar defumados originários de Maryland, que

correspondem a um único perfil (neste caso, sorotipo 1 /2 b). Semelhantemente, Destro e col. 1996, pesquisando a transmissão de *L. monocytogenes* em plantas de processamento de camarões, em Santos, utilizaram o método PFGE para discriminação dos perfis genotípicos de cepas isoladas de alimentos, superfícies de contato com alimentos, mãos dos operadores, água, gelo e ambiente de uma planta de processamento de camarões nas cidades de Santos e São Paulo. Os autores identificaram perfis semelhantes entre as cepas analisadas, indicando a existência de contaminação persistente de *L. monocytogenes* no ambiente e mãos dos manipuladores e indicam o emprego de mais de um método de avaliação genética em estudos epidemiológicos.

Unnerstat e col. 2000, procedendo a análise de similaridade pelo método PFGE identificaram 3 cepas de mesma similaridade e provenientes de vacas da mesma fazenda. Uma das vacas também carregava outra cepa de *L. monocytogenes*, que não compartilhou o mesmo perfil das demais. Utilizaram as enzimas *Apa I*, *Sma I* e *Asc I*, tendo esta última mais específica para uma das cepas analisadas. As demais cepas que apresentaram menor similaridade eram provenientes de fazendas diferentes.

Farber e col. 2003, utilizaram o PFGE com grande sucesso para a investigação de um pequeno surto de *L. monocytogenes* em alimento derivado de caranguejo. Os autores comprovaram a clonalidade microbiológica entre as cepas presentes nos alimentos da geladeira sobras do consumido e amostras

clínicas da paciente. Utilizando a enzima *AscI* identificaram um perfil de similaridade de 100%.

O presente estudo também identificou clones microbiológicos originários de alimentos que não apresentam relação entre si, como é o caso das cepas 116/05 e 117/05 (Figura 4), originárias de carne bovina moída e moela de frango, respectivamente. Como o trabalho foi desenvolvido a partir de coleção de cepas, sem a identificação de procedência ou data de isolamento, passa-se a desenhar suposições que justifiquem a clonalidade microbiológica advinda de produtos tão diferentes, como é o caso da carne moída bovina e moela de frango.

A clonalidade microbiológica foi observada em diferentes alimentos e regiões geográficas por alguns autores, sugerindo uma dispersão de bactérias de mesma ancestrabilidade por várias partes do planeta. Contudo, a hipótese mais provável que envolve a presença de clones microbiológicos em diferentes fontes, é a da contaminação cruzada, de matérias primas e produtos acabados e a partir de contaminação persistente em plantas de processamento de alimentos. (Destro e col. 1996; Nakamura e col. 2004; Grif e col. 2001; Farber e col. 2003).

Kerouanton e col. 1998 consideraram o método PFGE com maior poder discriminatório, entre outros métodos fenotípicos e moleculares utilizados. As cepas provenientes de amostras isoladas dos surtos foram classificadas em perfis bem distintos das provenientes da mesma planta de processamento, que por sua vez, apresentou grande semelhança entre os perfis encontrados. Esse

resultado também é compatível ao de Destro e col. 1996, que identificou o perfil de similaridade de cepas originárias de camarão, equipamentos e planta de processamento de camarões, em 1996, Santos, São Paulo. Com o emprego do método PFGE, utilizando a enzima *Apa I*, os autores identificaram 15 perfis de similaridade entre 115 cepas estudadas e estabeleceram relação de contaminação persistente na planta de processamento estudada.

Compartilhando o mesmo entendimento dos autores, o presente estudo sugere a adoção de mais de um método para confirmação da diversidade genética de *L. monocytogenes*, sendo a técnica PCR para identificação de genes de virulência para confirmação da espécie e outras técnicas discriminatórias para análise de similaridade das cepas entre si, como foi o caso do PFGE. A partir do emprego de técnicas de extração, dos grupos de iniciadores e das enzimas de clivagens utilizadas pelo trabalho, consideramos os resultados bem sucedidos.

Os resultados do presente trabalho condizem com os achados de Autio e col. 2004, quanto à variabilidade dos perfis encontrados em cepas provenientes de frigoríficos suínos, mesmo considerando no presente estudo o não conhecimento da procedência das cepas.

Finalizando, a análise dos resultados obtidos no dendograma ilustrado na Figura 4, foi observado o posicionamento da cepa controle ATCC 19111 originária de amostra de frango, Inglaterra, no diferente posicionamento frente às demais cepas estudadas. O posicionamento no grupo externo ao grupo de estudo demonstrou uma grande distinção genética da cepa que é muito mais

antiga e originária de outro país (Inglaterra), confirmando o potencial discriminatório que o método PFGE proporciona. Esse dado condiz com os resultados encontrados por Gilbreth e col. 2005, que analisaram 544 isolados provenientes de diferentes regiões, épocas climáticas e tipo de amostra, se clínica ou de alimentos e encontraram grande variabilidade genotípica e eventual similaridade, nem sempre relacionada a essas variáveis.

5.2.2 – Análise de Similaridade das Cepas Controle

Conforme observado na Figura 5, a grande variabilidade genotípica encontrada confirma a diversidade existente inclusive entre cepas de mesmo substrato, como o caso das cepas IAL 1980, ATCC 19115 e IAL 1982, provenientes de amostras clínicas, mas com perfil genotípico distinto, não havendo relação epidemiológica entre elas, apesar de classificadas no mesmo grupo.

Assim como no presente estudo, foi encontrada clonalidade microbiológica em cepas de origem clínica por Farber e col. 2003, que investigaram um pequeno surto de *L. monocytogenes* em produto derivado de caranguejo. Os resultados identificaram que as cepas de origem clínica eram clones das cepas contaminantes dos alimentos ingeridos e os resultados foram suficientes para elucidar o surto, incriminando o alimento envolvido. Utilizando a enzima *AscI* os autores identificaram um perfil de similaridade de 100%, afastando possibilidades de diagnóstico equivocado.

A Figura 5 demonstra ainda um agrupamento de duas cepas IAL 0633 e IAL 1979, que embora não sejam clones microbiológicos, apresentam grande semelhança entre si e quando analisadas juntamente com o grupo de alimentos curiosamente, apresentaram similaridade e ficaram agrupadas dentro do grupo de estudo. A partir de informações colhidas verbalmente no Instituto Adolpho Lutz, fornecedor das cepas, estas são de origem brasileira e provavelmente provenientes de alimentos¹. Tal fato justifica, pelo menos em parte, a classificação destas no agrupamento de cepas de alimentos analisadas (Figura 6).

Grif e col. 2001, na Áustria, aplicando a técnica de PFGE foram analisados 64 isolados provenientes de 4 pacientes aparentemente saudáveis e um caso clínico de listeriose. Os resultados do emprego da técnica PFGE indicaram que de um único paciente aparentemente saudável foram encontrados 3 diferentes perfis de similaridade. O estudo também indicou que outros três pacientes clinicamente saudáveis, sem qualquer ligação epidemiológica, apresentaram perfis idênticos e o caso clínico apresentou perfil distinto dos demais. Esses resultados condizem com a grande variabilidade genética encontrada na natureza e confirmada por outros autores (Wagner e Allerberger, 2003; Unnerstad e col. 2000).

1 – Informação fornecida verbalmente por Mônica Cândida Georgete Scola, Depto de Coleção de Culturas do Instituto Adolpho Lutz, São Paulo.

Giavannacci e col. 1999, na França avaliaram 287 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de carne suína, equipamentos e ambientes provenientes de cinco frigoríficos de suínos com a finalidade de identificar as fontes de contaminação de cortes de suínos provenientes destes. Empregando a técnica de PFGE com o emprego da enzima *Apal*, os autores encontraram 17 perfis de similaridade em 287 isolados. O estudo se conduz em dois momentos diferentes: no primeiro, a avaliação revelou um perfil de similaridade muito próximo das cepas isoladas um ano seguinte, sugerindo que as cepas foram descendentes do mesmo ancestral, cujas alterações genéticas supõem uma mutação genética das cepas identificadas inicialmente. Segundo os autores, esse achado confirma a tese de que as cepas de *L. monocytogenes* foram originariamente provenientes dos porcos, mas que acabam desenvolvendo condições de adaptação ao ambiente, caracterizando a contaminação persistente, fenômeno este relatado por outros vários autores (Destro e col. 1996; Unnerstad e col., 2000; Vogel e col. 2001; Autio e col. 2004; Nakamura, 2004).

5.2.3 – Análise de Similaridade do Total de Cepas Estudadas e Controle

A Figura 6 demonstrou no geral, uma grande variabilidade genética representada praticamente todos os tipos de alimentos, temperaturas, cortes empregados e presença de temperos. Foram observados 18 perfis de restrição diferentes, sendo que em duas situações foram encontrados perfis de

clonalidade microbiológica (116/05 e 117/05 e 123/05 e 118/05). A variabilidade genética variou entre 84 e 100%. A partir desse observado, aparentemente não foi estabelecida relação direta entre os perfis genotípicos e respectivos grupamentos e as condições de temperatura, se congeladas ou refrigeradas; condições de industrialização; tipos de corte, se fatiados, picados ou carcaça e adição de temperos, se presente ou não.

O estudo de diversidade empregando a digestão com enzima de restrição *apa I* demonstrou diversos fragmentos com peso molecular variando entre 48,5 e 582,0 kb. Utilizando a mesma enzima Kerouanton e col. 1998 encontraram fragmentos variando entre 20 e 550 Kb e Destro e col. 1996 entre 20 e 557,2 kb.

Gilbreth e col. 2005, semelhantemente ao obtido no presente estudo, encontraram uma grande diversidade genotípica, tendo sido observado 139 perfis de similaridade em 544 isolados, tanto entre as cepas originárias de alimentos, quanto de amostras clínicas, sendo que nesta última categoria a diversidade foi mais acentuada, apresentando 35 perfis em 42 isolados de origem clínica.

No presente estudo o posicionamento das cepas de origem clínica em grupo distinto dos alimentos também é confirmada por Gilbreth e col. 2005, porquanto que ao comparar as características genotípicas entre cepas originárias de alimentos e amostras clínicas, houve uma diversidade entre as duas categorias, sem apresentar, portanto, homogeneidade em relação aos

perfis das cepas originárias dos alimentos, ressalvados os casos em que as cepas são provenientes da mesma região, como já discutido anteriormente.

Leite e col. 2005, analisando comparativamente cepas oriundas de queijos e amostras clínicas de pacientes identificou similaridade entre cepas originárias de alimento, mas não foi estabelecida relação de similaridade entre esses perfis e os de amostras clínicas, reforçando o entendimento obtido no presente estudo de que há uma grande variabilidade genotípica entre cepas de *L. monocytogenes* distribuída na natureza; a similaridade de cepas de alimentos pode sugerir uma contaminação ambiental de cepas resistentes e há uma grande distinção de perfis genotípicos entre cepas originárias de alimentos e de amostras clínicas.

O fato dos resultados indicarem uma grande variabilidade genética em diferentes tipos de alimentos e seus estágios de processamento, amostras clínicas, procedência e idade cronológica, torna o presente estudo de grande valia para a confirmação do entendimento de que a *L. monocytogenes* é um importante agente patogênico que acomete a população prioritariamente imunodeprimida e está amplamente disseminado na natureza e, pelas razões expostas, ainda carece de maiores estudos.

6 - CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos é lícito concluir que:

6.1 – A confirmação da espécie *L. monocytogenes* pelo método PCR mostrou que 35% das cepas não eram a espécie em questão.

6.2 – Das cepas que não confirmaram a espécie *L. monocytogenes*, 2 (6%) foram confirmadas como *Listeria spp*, 4 (13%) não confirmaram ser *Listeria spp* e cinco (16%) não apresentaram resultados conclusivos.

6.3 – Foram identificados 18 perfis de similaridade do total das cepas avaliadas, por meio do emprego da técnica PFGE, com o uso da enzima de restrição *Apa I*. A análise apresentou um perfil de similaridade de 84 a 100%, a partir da análise do coeficiente de similaridade de Pearson.

6.4 – Foram identificados dois pares de clones microbiológicos, sendo um dos pares oriundo de amostras diferentes do mesmo tipo de alimento, mas sem informações sobre a relação epidemiológica entre si. O outro par de clones microbiológicos foi oriundo de amostras de alimentos diferentes, sem informações sobre sua relação epidemiológica.

6.5 – A cepa de identificação 121/05, de *steak* de frango, apresentou perfil genotípico diferente dos demais isolados, possivelmente por tratar-se de um produto industrializado, podendo caracterizar contaminação cruzada após o processamento, enquanto os demais produtos com perfis com maior similaridade eram todos crus, exceto a salsicha, que embora industrializada, foi

agrupada junto com as demais cepas de alimentos crus, pelo perfil de similaridade de Pearson.

6.6 - Apenas duas cepas do grupo controle (370/05 e 373/05), foram agrupadas juntamente com as cepas estudadas. A hipótese que possivelmente justifica tal comportamento é a de que as referidas cepas controle são provenientes da coleção de cultura do Instituto Adolpho Lutz e provavelmente foram isoladas de amostras de alimentos no Brasil, segundo informações fornecidas verbalmente¹.

6.7 - Foi identificado um par de clones microbiológicos entre as cepas controle. Não há informação sobre vínculo epidemiológico entre elas, apenas que são de procedência clínica de humanos.

6.8 - Foi observada uma grande variabilidade genética representada praticamente todos os tipos de alimentos, aparentemente não estabelecendo correlação entre os perfis genotípicos e as condições de temperatura, se congeladas ou refrigeradas; tipo de corte, se fatiados, picados ou e carcaça e adição de temperos, se presente ou não.

6.9 - As técnicas moleculares de PCR para identificação dos genes 16S rRNA e Internalina A e B foram eficientes na identificação de *Listeria spp* e *L. monocytogenes*.

¹ - Informação fornecida verbalmente por Mônica Cândida Georgete Scola, Depto de Coleção de Culturas do Instituto Adolpho Lutz, São Paulo.

6.10 - O método PFGE mostrou-se efetivo e específico, podendo ser recomendado como uma técnica de alta especificidade, reproduzibilidade, rapidez e confiabilidade para identificação do perfil genotípico de *L. monocytogenes*.

6.11 – O presente estudo propõe a adoção de mais de um método para confirmação da diversidade genética de *L.monocytogenes*, sendo a técnica de PCR para a identificação de genes de virulência, para a confirmação da espécie e outras técnicas discriminatórias para análise de similaridade das cepas entre si, como o PFGE.

6.12 – Espera-se que os resultados em tela contribuam para o desenvolvimento de estudos sobre a *L. monocytogenes*, de maneira a promover o controle e prevenção deste importante patógeno.

7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vogel e col. 2004 afirmam que vários aspectos devem ser considerados na seleção dos métodos adotados no estudo da *L. monocytogenes*. Diferenças em poder discriminatório, espectro de uso, custo de recursos empregados, custo de equipamentos, além de critérios como tipologia e reprodutibilidade da técnica, entre outros, definem a opção de escolha.

Unnerstat e col. 2000, pesquisando a presença de *L. monocytogenes* em fezes de 102 vacas clinicamente saudáveis provenientes de 34 fazendas da Suécia encontraram uma prevalência de 6% de *L. monocytogenes*, indicando a importância do controle da contaminação de origem da matéria prima alimentar, a começar da forragem utilizada como alimento para o gado, que contaminada, infecta o trato gastro-intestinal do animal.

Além das importantes contribuições para as comunidades científicas relacionadas à identificação e análise de variabilidade genotípica da *L. monocytogenes*, cabe destacar que os resultados deste estudo trouxeram um novo enfoque sobre o patógeno e sua importância para a saúde pública, percorrido a seguir:

A *L. monocytogenes* está amplamente disseminada em vários sistemas ecológicos e freqüentemente aparece envolvida em ciclos epidemiológicos de listeriose, nos quais os alimentos representam importantes veículos de infecção, conforme observado pelo presente trabalho e de outros autores. A alta gravidade da doença e, em especial, no caso de gestantes, quando é responsável por índices de 30% a 50% de partos prematuros, abortamentos e

morte neonatal, justifica novos investimentos no estudo da listeriose (Schwab & Edelweiss, 2003; Smerdon e cols, 2001; Benshushan A e cols., 2002; Siegman-Igra e cols, 2002; Laciari e col., 2000; Hofer e cols, 1998). Outro aspecto relevante a ser destacado, é relativo às dificuldades de isolamento causadas pela baixa contagem presente no alimento e ambiente, bem como pela sua capacidade de infecção intracelular (Gasanov e col. 2005; Beumer e Hazeleger 2003; Germano & Germano 2003; Pizarro-Cerdá e col. 2003; Holko e col. 2002). Essas características, associadas ao fato de que a bactéria apresenta alta virulência, a partir de baixa dose infectante, dificultam o controle e prevenção da listeriose e colocam a doença na condição de relevância para a saúde pública, nas esferas das vigilâncias sanitária e epidemiológica, envolvendo a investigação de surtos, o desenvolvimento de novas técnicas de garantia da qualidade e inocuidade de alimentos, consolidação do comércio exterior de alimentos, entre outros (Inglis e col. 2003).

A desinformação dos profissionais da saúde sobre o agente; as dificuldades de diagnóstico de listeriose; a demora na investigação de um surto; as dificuldades de isolamento da *L. monocytogenes*; o alto custo na implantação das técnicas moleculares são alguns dos fatores que comprometem a eficiência da vigilância epidemiológica da listeriose, opinião compartilhada por Inglis e col. 2003.

A capacidade da bactéria de formar biofilmes vem sendo um dos maiores desafios no controle sanitário e garantia de inocuidade dos alimentos. A resistência das cepas analisadas à ação dos agentes sanitizantes demonstra a

importância para a vigilância sanitária e indústrias sobre novos processos e produtos saneantes que sejam mais eficientes no controle desse importante patógeno. Além de máquinas e equipamentos que fazem contato direto com o alimento, alguns locais e equipamentos que raramente são higienizados, como ventiladores, paredes altas, filtros de ar e outros, podem ser reservatórios de contaminação persistente de *L. monocytogenes* (Gasanov e col., 2005; Germano & Germano 2003; Inglis e col. 2003; Farber e col. 2003; Unnerstad e col. 2000; Giovanacci e col. 1999; Destro e col. 1996; Leite e col. 2005).

No Brasil os índices de prevalência de *Listeria spp* e *L. monocytogenes* sugerem ser superiores à de outros países, apesar do pequeno número de trabalhos desenvolvidos a respeito (Hof e col., 2003). Silva e col. (2004) pesquisaram *Listeria spp* pelos métodos fenotípico e bioquímico em 41 amostras de matéria-prima, equipamentos e produto final lingüiça frescal no Rio Grande do Sul e identificaram uma incidência de 100% de *Listeria spp* e 29% de *L. monocytogenes*. Quando considerada a incidência em amostras de matérias primas foram encontrados os índices de 33% em carne bovina; 33% em carne suína e 20% de gordura suína, não tendo sido encontrada em amostras de carne mecanicamente separada de frango. Avaliando os frigoríficos foi encontrada a prevalência de *L. monocytogenes* variando entre 8 e 47% nas superfícies de contato de três diferentes frigoríficos avaliados.

Com o emprego das técnicas moleculares a instituição do sistema APPCC nas plantas de processamento de alimentos passa a ser mais acurada e facilita o controle dos perigos de natureza microbiológica, mormente aqueles

causados pela *L. monocytogenes* (Hof e col. 2003 ; Leite e col. 2005; Farber e col. 2003)

Tendo em vista a escassez de publicações envolvendo o estudo da *L. monocytogenes* no Brasil, situação compartilhada e referida por Beumer e col. 2003, Estados Unidos da América, entende-se que o presente trabalho traz uma contribuição valiosa para o âmbito da saúde pública. Considerando o aumento da prevalência de *L. monocytogenes*, no mundo todo (Gasnov e cols, 2005; Roccourt e cols, 2003); faz-se justificada a necessidade de maiores estudos, como o presente, a respeito do comportamento da bactéria, sua prevalência, mecanismos de virulência e outros fatores de relevância para a saúde pública, a fim de serem estabelecidos critérios mais específicos de controle da veiculação da infecção. A partir do observado no presente estudo e considerando os autores estudados, destacam-se alguns aspectos que exigem reflexão sobre a importância do emprego das técnicas moleculares utilizadas a partir dos fatores descritos a seguir:

a) a *L. monocytogenes* é um importante agente patógeno que utiliza o alimento como veículo de transmissão da infecção, mecanismo este já amplamente comprovado pela literatura;

b) embora seja uma doença com baixa prevalência, há um aumento nos casos de listeriose notificados em várias partes do mundo, mas ainda há pouca informação sobre a vigilância epidemiológica da bactéria no Brasil, assim como em alguns outros países;

c) a doença causada pela bactéria apresenta alta gravidade, como letalidade de até 50%, acometendo principalmente populações de imunodeprimidos, gestantes, recém-nascidos e idosos;

d) o Brasil apresenta valores levemente superiores de prevalência de *L. monocytogenes*, quando comparados com os de outros países (Hofer e cols., 2000);

e) a disseminação das metodologias moleculares contribui com o desenvolvimento do país, principalmente no segmento de exportações de alimentos industrializados;

f) as dificuldades de isolamento da *L. monocytogenes* são minimizadas com o emprego da amplificação da cadeia de polimerase utilizadas pelo método PCR, que pode ser empregado inclusive diretamente sobre amostras de alimentos suspeitas de contaminação, após enriquecimento específico, dispensando o emprego anterior de métodos fenotípicos;

g) a característica da bactéria em se multiplicar sob refrigeração, podendo atingir contagens capazes de causar dano a populações de risco;

h) a identificação da *L. monocytogenes* poderá ser facilitada com o emprego das técnicas moleculares que identificam genes específicos de virulência, independentemente da presença intracelular da bactéria, o que dificulta seu isolamento, ou ainda, da viabilidade da célula na amostra analisada;

i) o longo período de incubação do patógeno dificultando a vigilância epidemiológica na ocorrência de surtos;

j) a possibilidade de fechar diagnóstico na investigação de surtos a partir da análise do perfil genético das cepas provenientes de amostras clínicas e de alimentos isoladas de amostras suspeitas de contaminação; e,

l) o sistema APPCC e as Boas Práticas de Fabricação ganham condições de identificar os pontos críticos de controle com maior precisão, promovendo maior eficiência em seu desempenho.

8 - REFERÊNCIAS

Abram M, Shluter D, Vuckovic D, Wraber B, Doric M, Deckert M. Murine model of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection. **FEM Immunol Med Microbiol** 2003; 35:177-82

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº12, de 10.01.02: Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimento. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 de janeiro de 2002.

Aguado V, Vitas AI, Garcia-Jalon I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listera innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. **Int J Food Microbiol** Feb 2004; 341-47

Allerberger F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2002; 35:183-89

Alpas H, Bozoglu F. Efficiency of higt pressure treatment for destruction of *Listeria monocytogenes* in fruit juices. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2003; 35:269-73

AOAC International. **Official Methods of Analysis International**. Gaithersburg, 2000.

Aureli P, Ferrini AM, Mannoni V, Hodzic S, Wedell-Weergaard C, Oliva B, Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. **Int J Food Microbiol**, 2003; 83: 325-30.

Autio T, Markkula A, Hellstrom S, Niskanen T, Lunden J, Korkeala H. Prevalence and Genetic Diversity of *Listeria monocytogenes* in the Tonsils of Pigs. **J Food Protection** 2004; 67 (4): 805-808

Benshushan A, Tsafrir A, Arbel R, Ravav G, Ariel I, Rojansky N. Listeria infection during pregnancy: a 10 year experience. **Isr Med Assoc J** out 2002; 4 (10): 776-80.

Beumer RR, Hazeleger WC. *Listeria monocytogenes*: diagnostic problems. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2003; 35:191-197

Borucki MK, Call DR. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. **J Clin Microbiol** Dec. 2003; 55:37-40

Breer C, Schopfer K, **Listeria and Food**, Lancet 2, 1988.

Bubert A, Kohler S, Goebel W. The homologous and heterologous Regions within the *iap* Gene Allow Genus – and Species-Specific identification of *Listeria* spp. by Polymerase Chain Reaction. **Appl Environ Microbiol** Aug. 1992; 2625-32

Buchanan R and Lindqvist R. Joint FAO/WHO Activities on Risk Assessment of Microbiological Hazard in Foods. Hazard Identification and Hazard Characterization of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Preliminary reports MRA 00/01. World Health Organization, Geneva 2000.

Buchrieser C, Rusniok C, Kunst F, Cossat P, Glaser P. Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2003; 35:207-13

Byun S, Jung SC, Yoo HS. Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. **Int J Food Microbiol** 2001; 69:227-235

Choi WS, Hong C. Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in milk using competitive PCR. **Int J Food Microbiol** 2003; 84:79-85

Cisternas AV, Lagos NN, Gaistuch, Gonzáles, Garcia CC, Diaz JT. Infeccion por *Listeria monocytogenes* y embarazo com buen resultado perinatal. **Rev Chil Obstet Ginecol** 2002; 67(3): 237-241.

Destro MT, Leitão MFF, Farber JM. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Appl Environ Microbiol** fev. 1996; 705-711.

Doganay M. Listeriosis: clinical presentation. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2003; 35:173-75

Dominguez L, Cepeda A. Determination of the principal sources of *Listeria spp.* contamination in poultry meat and a poultry processing plant. **J Food Protection** 1995; 12:1320-25.

Donini CA. **Contribuição ao estudo epidemiológico da listeriose, como zoonose de causa alimentar**. São Paulo; 1997 [Dissertação para obtenção do título de Mestre – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martins P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **J Clin Microbiol** Aug. 2004; 3819-22

Dykes GA. Influence of the adaptation of *Listeria monocytogenes* populations to structured or homogeneous habitats on subsequent growth on chilled processed meat. **Int J Food Microbiol.**, 2003; 85: 301-306.

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

Eppert I, Lechner E, Mayr K, Scherer S. Listerien und coliforme Keime in "echten" und "fehldeklarierten". Rohmilchweichkäsen. **Aech Lebensmittelhygiene** 1995; 4: 85-88.

Ericsson H, Eklow A, Danielsson-Tham M-L, Loncarevic S, Mentzing L-O, Persson, et al. An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. **J Clin Microbiol**, Nov. 1997; 2904-07

FAO/WHO 2001 Joint FAO/WHO Expert consultation on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods. Risk Characterization of Salmonella in Eggs and Broilers and *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods. FAO and Food Nutrition Paper n. 72. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Farber JM, Daley EM, Mackie MT, Limerick B. A small outbreak of listeriosis potentially linked to the consumptions of imitation crab meat. **Lett Appl Microbiol** 2003; 31:100-104.

Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen, **Microbiol Rev** 1991; 55: 476-511.

Forsythe, **Microbiologia da Segurança Alimentar**, Artmed, Porto Alegre, 2002.

Franciosa, G., Pourshaban, M., Gianfranceschi, M., Aureli, P. Genetic typing of human and food isolates of *Listeria monocytogenes* from episodes of listeriosis. **Eur J Epidemiol** 1998; 14:205-210

Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiol Rev**, 2005; 29:851-875

Germano & Germano, **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo:Varela; 2003.

Giavannacci, I, Ragimbeau C, Queguiner S, Salvat G, Vendeuvre J-L, Carlier V, Ermel G. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. **Int J Food Microbiol**, 1999; 53:127-40

Gilbreth SE, Call JE, Wallace FM, Scott VN, Chen Y, Luchansky JB. Relatedness of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from selected ready-

to-eat food and listeriosis patients in the United States. **Appl Environ Microbiol** Dec. 2005; 81:15-22.

Graves LM, Swaminathan B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. **Int J Food Microbiol** 2001; 65:55-62.

Grif K, Hein I, Wagner M, Brandl E, Mpamugo O, McLauchlin J, et al. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* in the feces of healthy Austrians. **Wien Klin Wochenschr** 2001; 113(19):737-42

Hof H. History and epidemiology of listeriosis. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2003; 35:199-202

Hof H. Therapeutic options. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2003; 35:203-05

Hofer E, Ribeiro R, Feitosa DP. Species and Serovars of the Genus *Listeria* Isolated from Different Sources in Brazil from 1971 to 1997. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, sep/oct. 2000; 95 (5): 615-620.

Hofer E, Nascimento RS, Oliveira MA. Meningite por *Listeria monocytogenes*. relato de casos em pacientes do distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 1998; 31(2) 173-177.

Holko I, Urbanová J, Kantikova M, Pastorova K, Kmet V. PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in Milk and Milk Products and Differentiation os Suspect Isolates. **Acta Vet Brno** 2002; 71:125-31.

Inglis TJJ, Clair A, Sampson J, O'reilly L, Vandenberg S, Leighton K, Watson A. Real-time application of automated ribotyping and DNA macrorestriction analysis in the setting of a listeriosis outbreak. **Epidmiol Infect** 2003; 131:637-45.

Jaradat ZW, Schutze GE, Bhunia AK. 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. **Int J Food Microbiol** 2002; 76:1-10

Jeffers GT, Bruce JL, McDonough L, Scarllet J, Boor Kj, Wiedmann M. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. **Microbiology** 2001; 147:1095-104

Jorge; Gotlieb; Laurenti, **A saúde no Brasil: análise do período 1996 a 1999** Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2001.

Jung YS, Frank JF, Brackett RE, Chen J. Polymerase Chain Reaction Detection of *Listeria monocytogenes* on Frankfurters Using Oligonucleotide Primers

Targeting the Genes Encoding internalin AB, **J Food Protection** 2003, 66(2): 237-41

Kamm C, Skoberne M, Geginat G. CD8 cell immunone analysis of *Listeria monocytogenes*. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2003; 35:235-42

Kerouanton A, Brisabois A, Denoyer E, Dilasser F, Grout J, Salvat G, Picard B. Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *Listeria monocytogenes*. **Int J Food Microbiol** 1998; 43: 61-71

Kolb-Maures A, Kammerer U, Maurer M, Gentschev I, Brocker E, Rieckmann P, Kampgen E. Production of IL-12 and IL-18 in human dendritic cells upon infection by *Listeria monocytogenes*. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2003; 35:255-262

Laciar AL, Vaca L, Centorbi ONP. *Listeria spp* em alimentos de origem animal. **Rev Argent Microbiol** 1999; 31: 25-30.

Laciar AL, Hassuoka RP, Correa SM, Miranda AM, Centorbi ONP. Symptomatic Hydrocephalus in a Newborn Infected with *Listeria monocytogenes*. **Brazilian Journal of Microbiology** 2000; 31:09-11

Lawrence LM, Gilmour A. Incidence of *Listeria* ssp. And *listeria monocytogenes* in a poultry products and their rapid confirmation by Multiplex PCR. **Appl Environ Microbiol** 1994; 60: 4600-604.

Leite P, Rodrigues R, Ferreira M, Ribeiro G, Jacquet C, Martin P, Brito L. Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans. **Int J Food Microbiol** (Article in Press) 2005.

Liu D, Ainsworth AJ, Austin FW, Lawrence ML. Characterization of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator and internalin genes. **J Med Microbiol** 2003; 52:1065-70

Lunge Vr, Miller BJ, Livak KJ, Batt CA. Factors affecting the performance of 5' nuclease PCR assays for *Listeria monocytogenes* detection. **J Microbiol Methods** 2002; 51:361-68

Malak M, Vivier A, André P, Decallonne J, Gilot P. RAPD analysis, serotyping, and esterase typing indicate that the population of *Listeria monocytogenes* strains recovered from cheese and from patients with listeriosis in Belgium are different. **Can J Microbiol** 2001; 47:883-87

Matinez I, Rorvik L-M, Brox V, Lassen J, Seppola M, Gram L, Fonnesbech-Vogel B. Genetic variability among isolates of *Listeria monocytogenes* from food products, clinical samples and processing environments, estimated by RAPD typing. **Int J Food Microbiol** 2003; 285:97

Matté MH, Almeida TTC, Araújo RS, Dropa M, Rojas R, Matté GR. **Convention method for extraction of genomic DNA generally applicable to pathogenic bacteria**, 2005. Trabalho em preparação.

Matte, GR. Estudo de *Vibrio* spp. potencialmente patogênicos através de métodos moleculares. São Paulo; 2003 [Tese livre-docência – Faculdade de Saúde Pública da USP]

Milner MG, Saunders JR, McCarthy AJ. Relationship between nucleic acid ratios and growth in *Listeria monocytogenes*. **Microbiology** 2001; 147:2689-96

Nakamura H, Hatanaka M, Ochi K, Nagao M, Ogasawara J, Hase A, et al. *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish products in Osaka City, Japan. **Int J Food Microbiol** Aug. 2004; 323-328

Pellicer K, Copes J, Mavestiti L, Lanfrachi M, Stanchi N, Echeverria G, Nosetto E. Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp* em

embutidos secos obtenidos em mercados de la ciudad de La Plata, Argentina.

Rev Argent Microbiol 2002; 34: 219-21.

Peters C, Domann E, Darbouche A, Chakraborty T, Mileke MEA. Tailoring host immune responses to *Listeria* by manipulation of virulence genes – the interface between innate and acquired immunity. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2003; 35:243-53

Piatti RM, Rojas MVR, Otuki AK, Baldassi L. Presença de *Listeria monocytogenes* em amostra de caprinos com sintomatologia nervosa. **Arq Inst Biol** 2004; 71 (suplemento):1-749.

Pizarro-Cerdá J, Sousa S, Cossart P. Exploitation of host cell cytoskeleton and signalling during *Listeria monocytogenes* entry into mammalian cells. **C R Biologies** Nov 2004; 327: 523-531.

Rijpens N, Vlaemynck G, Rossau R, Herman L, Jannes G. Unidentified *Listeria*-like bacteria isolated from cheese. **Lett Appl Microbiol** 1998; 27:198-202.

Rocourt J, BenEmbarek P, Toyofuku H, Shlundt J. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHOP approach. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2003; 35:263-67

Rodrigues D, Landgraf M, Destro MT. Evaluation of two commercial methods for the detection of *Listeria* sp. and *Listeria monocytogenes* in chicken nugget processing plant. **Can J Microbiol** 2002; 48:275-78

Rousseaux S, Olier M, Lemaitre JP, 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. **Appl Environ Microbiol** Apr. 2000; 2180-85.

Schwab, JP & Edelweiss MIA. Identificação imuno-histoquímica de *Listeria monocytogenes* em placentas fixadas em formol e embebidas em parafina. **Rev. Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia** 2003; 25(7): 501-505.

Schwab JP & Edelweiss MIA. Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunoistoquímica. **Jornal Brasileiro de patologia e Medicina Laboratorial** 2003; v. 39, n.2 111-114.

Schmid M, Walcher M, Bubert A, Wagner M, Schleifer K. Nucleic acid-based, cultivation-independent detection of *Listeria* ssp. and genotypes of *L. monocytogenes*. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2003; 35:215-225.

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE. Manual das Doenças Transmítidas por Alimentos. *Listeria monocytogenes* / Listeriose. Disponível em <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Listeria.htm>>.[2004 mar 26].

Secretaria Municipal de Abastecimento – SEMAB. Disponível em <<http://www6.prefeitura.sp.gov.br/noticias/sec/abastecimento/2003/11/2002>>.[2004 mar 26]

Seeliger HPR, Jones D. Genus *Listeria* Pirie, 1940, 380 AL. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 2 (Sneath PH, Mair NS, Holt JG, Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1986; 1235-45

Siegman-Igra Y, Levin R; Weinberger M; Golan Y, Schwartz D, Samra Z, Konigsberger H, Yinnon A, Rahav G, Keller N, bisharat N, Karpuch J, Finkelstein R, AlkanM, Landau Z, Novikov J, Hassin D, Rudnicki C, Kitzes R, Ovadia S, Shimoni Z, lang R, Shohat T. *Listeria monocytogenes* infection in Israel and review of cases worldwide. **Emerg Infect Dis** Mar 2002; 8(3): 305-10.

Silva MCD, Destro MT, Hofer E, Tibana A. Characterization and evaluation of some virulence markers of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Brazilian cheeses using molecular, biochemical and serotyping techniques. **Int J Food Microbiol** 2001; 63:275-280

Silva WP, Lima AS, Gandra EA, Araújo MR, Macedo MRP, Duval EH *Listeria* ssp. In the processing of fresh sausages in slaughterhouses from Pelotas, RS, Brazil. **Ciência Rural** maio/jun. 2004; 34 (3).

Semrdon WJ, Jones R, McLauchlin J, Reacher M. Surveillance of listeriosis in England and Wales. **Commun Dis Public Health** Sep. 2001; 4(3):188-93.

Somer L, Kashi Y. A PCR method based on 16S rRNA sequence for simultaneous detection of the genus *Listeria* and the species *Listeria monocytogenes* in food products. **J Food Prot** 2003; 66(9):1658-65

Unnerstad H, Ericsson H, Danielsson-Tham M-L, Tham W. *Listeria monocytogenes* in Faeces from Clinically Healthy Dairy Cows in Sweden. **Acta Vet. Scand** 2000; 41:167-171.

Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche M, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel G et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clin Microbiol Rev** 2001; 14: 584-640

Vogel BF, Füssing V, Ojienyi B, Gram L, Ahrens P. High-Resolution Genotyping of *Listeria monocytogenes* by Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis Compared to Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Random Amplified Polymorphic DNA Analysis, Ribotyping, and PCR-Restriction

Fragment Length Polymorphism Analysis. **J. Food Protection** 2004; 67 (8):1656-65.

Vogel BF, Jorgensen LV, Ojeniyi B, Huss HH, Gram L. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by Random Amplified Polymorphic DNA analyses. **Int J Food Microbiol** 2001; 65: 83-92

Wagner M, Allerberger F. Characterization of *Listeria monocytogenes* recovered from 41 cases of sporadic listeriosis in Austria by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2003; 35:227-34.

Wang R, Cao W, Johnson MG. 16S rRNA-Based Probes and Polymerase Chain Reaction Method To Detect *Listeria monocytogenes* Cells Added to Foods. **Appl Environ Microbiol** Sept. 1992; 2827-31.

ANEXOS

A.1 Meios de Cultura

A.1.1 Ágar Lúria

Bacto triptona	1,0%
Extrato de levedo microbiológico	0,4%
Cloreto de sódio	1,0%
Bacto agar	1,5%
pH=6,8	

A.1.2 Caldo Lúria

Bacto triptona	1,0%
Extrato de levedo microbiológico	0,4%
Cloreto de sódio	1,0%
pH=6,8	

A.2 Reagentes para extração de DNA genômico

A.2.1 TEI (Tampão Tris-EDTA-ressuspensão do pellet)

Tris-HCl	pH8,0	10mM
EDTA	pH8,0	1mM

A.2.2 SDS 10%

Dodecil sulfato de sódio, solução a 10% em água destilada pH = 7,2

A.2.3 Solução CTBA/NaCl

CTBA (brometo de cetilmetilamônio)	5%
NaCl	0,7M

Aquecer com agitação constante até dissolução completa dos grumos, utilizar pré-aquecido a 65°C.

A.2.4 TE II (Tampão Tris EDTA – ressuspensão do DNA)

Tris-HCl	pH = 8,0	10,0mM
EDTA	pH = 8,0	0,1mM

A.3 Reagentes para Eletroforese**A.3.1 TAE (Tampão tris-Acetato – EDTA)**

Solução 50X (estoque):

Tris – base	242,0 g
Ácido acético glacial	57,1mL
EDTA – Na ₂ pH = 8,0	100,0 mL
Água destilada q.s.p.	1000mL

A.3.2 Tampão corante 6X

Azul de Bromofenol	0,25%
Glicerina	30%