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

Uso da PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) para traçar
a disseminação de *Listeria monocytogenes* em uma linha
de produção de salmão “gravlax”

Cristina Durante Cruz

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Maria Teresa Destro

São Paulo
2003

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Cruz, Cristina Durante

C957u Uso da PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) para traçar a disseminação de *Listeria monocytogenes* em uma linha de produção de salmão “gravlax” / Cristina Durante Cruz. -- São Paulo, 2003.
60p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Destro, Maria Teresa

I. Microbiologia de alimentos I. T. II. Destro, Maria
• Teresa, orientador.

664.07 CDD

Cristina Durante Cruz

Uso da PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) para traçar a
disseminação de *Listeria monocytogenes* em uma linha de
produção de salmão "gravlax"

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra Maria Teresa Destro
(Orientador)

(1º Examinador)

(2º Examinador)

São Paulo, 8 de abril de 2003.

Aos meus pais Luiz César e Eliza dedico
por sempre acreditarem e fazerem parte
de todos os meus sonhos

**"A distância traz a saudade,
mas nunca o esquecimento."**

AGRADECIMENTOS

Meu muito obrigada à

Profa. Dra. Maria Teresa Destro pela orientação dedicada e segura durante o desenvolvimento deste trabalho e, especialmente pela amizade, confiança e incentivo que puderam tornar este momento uma realidade.

Profa. Dra. Bernadette Franco e Profa. Dra. Marisa Landgraf por acreditarem em meu potencial .

Profa. Dra. Elsa Mamisuka por abrir as portas do Laboratório de Microbiologia Clínica para que eu pudesse realizar meus experimentos.

Profa. Dra. Márcia Mayer pelas sugestões valiosas dadas na minha qualificação.

Kátia e Lúcia, por sempre estarem dispostas a ajudar com muito carinho.

Todos meus colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos: Alcina, Alexandra, Ângela, Cecília, Cláudia, Cristiano, Dory Fábio, Gunnar, Juliana, Jane, Kátia, Lina, Monika, Patrícia's", Paula, Rick, Vanessa's" e Viviane e do Laboratório de Microbiologia Clínica: Antônio, Carla, Carol, Cris, Ju, John e Nilton.

Priscila e Cristiano, ela por me passar seus conhecimentos na Área de Biologia Molecular , e ele por me auxiliar com a análise dos meus resultados.

Andréia, minha grande amiga, por sempre estar ao meu lado e Izabel por nunca me deixar desistir frente aos obstáculos.

"Amigos são anjos que nos deixam em pé quando nossas asas tem problemas em se lembrar de como voam."

CNPq pela concessão bolsa de estudo e FAPESP pelo apoio financeiro do projeto de pesquisa.

SUMÁRIO

Resumo	ix
Abstract	x
1 . Introdução	1
2. Objetivos	14
3. Material e Métodos	15
3.1. Cepas utilizadas.....	15
3.2. Método	20
3.2.1. Manutenção das cepas	20
3.2.2. PFGE	21
3.2.3. Tipagem sorológica	23
3.3. Análise dos resultados	24
4. Resultados e Discussão	25
5. Conclusões	49
Referências Bibliográficas	50

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do processamento industrial de salmão “gravlax”, indicando os pontos de coleta das amostras do salmão(S).....17
- Figura 2.** Representação esquemática do processamento industrial do salmão “gravlax”, indicando os pontos de coleta das amostras de manipuladores (M), ambientes(A) e de utensílios e equipamentos(U).....19
- Figura 3.** Representação esquemática da ativação e purificação das cepas de *Listeria monocytogenes* para serem usadas na tipagem por PFGE.....20
- Figura 4.** Representação esquemática do preparo dos plugs de células de *Listeria monocytogenes*, restrição e eletroforese em gel de campo pulsado..... 23
- Figura 5.** Perfis PFGE obtidos com a enzima de restrição *ApaI* para as 181 cepas de *Listeria monocytogenes* (P1 a P17) isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax”29
- Figura 6.** Perfis PFGE obtidos com a enzima de restrição *ApaI* para as 181 cepas de *Listeria monocytogenes* (P17 a P20) isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax”30
- Figura 7.** Representação dos padrões de bandas dos perfis PFGE obtidos com a enzima de restrição *ApaI* para as 181 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax”31

Figura 8. Perfis PFGE obtidos com a enzima de restrição <i>AscI</i> para as 181 cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> (C1 a C15) isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax”	33
Figura 9. Perfis PFGE obtidos com a enzima de restrição <i>AscI</i> para as 181 cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> (C16 a C28) isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax”	34
Figura 10. Representação dos padrões de bandas dos perfis PFGE obtidos com a enzima de restrição <i>Apal</i> para as 181 cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax”	35
Figura 11. Representação da relação genética entre os 60 perfis combinados de PFGE obtidos para as cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax” e uma cepa de <i>Salmonella</i> Typhi escolhida como grupo externo.....	46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Origem das 79 cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> isoladas das amostras de salmão coletadas em uma linha de processamento industrial de salmão “gravlax”	16
Tabela 2. Origem das 102 cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> isoladas das amostras de utensílios(U), ambiente(A) e manipulador(M) coletadas em uma linha de processamento industrial de salmão “gravlax”	18
Tabela 3. Grupos sorológicos das 181 cepas de <i>L. monocytogenes</i> empregadas neste estudo.....	26
Tabela 4. Distribuição das 181 cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax”, conforme os 30 perfis PFGE gerados com a enzima <i>ApaI</i>	32
Tabela 5. Distribuição das 181 cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax”, conforme os 28 perfis PFGE gerados com a enzima <i>AscI</i>	36
Tabela 6. Distribuição das 181 cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax”, conforme os 60 perfis combinados de PFGE obtidos com as enzimas <i>ApaI</i> e <i>AscI</i>	42
Tabela 7. Distribuição das 181 cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax”, conforme os 8 subtipos formados pela combinação dos resultados da sorologia e do PFGE.....	44
Tabela 8. Distribuição dos 8 subtipos de <i>Listeria monocytogenes</i> (I a VIII), obtidos pela combinação dos resultados da sorologia e do PFGE, nas diferentes etapas do processamento de salmão “gravlax”	45

Resumo

Listeria monocytogenes é de grande preocupação para a saúde pública e para indústrias de alimentos, pois pode causar meningite, septicemia e aborto. Trabalhos desenvolvidos em diversos países, bem como no Brasil, indicam que a presença de *L. monocytogenes* nas indústrias processadoras de pescado é freqüente. Com a finalidade de monitorar a contaminação por *L. monocytogenes* em plantas processadoras de alimentos e identificar as fontes de contaminação do produto têm-se empregado técnicas de biologia molecular. Dentre elas cabe destacar a PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis* - eletroforese em gel de campo pulsado), técnica baseada em macrorestrição genômica, através da utilização de uma enzima de restrição de baixa freqüência de corte, como a *SmaI*, *AscI* e *ApaI*, seguido de uma eletroforese em gel em campo pulsado. Neste estudo foram utilizadas 181 cepas de *L. monocytogenes* isoladas a partir de amostras de salmão "gravlax" colhidas nas diferentes etapas de processamento, além de amostras de manipuladores, ambientes e utensílios, coletadas em uma usina de processamento industrial a fim de verificar a diversidade antigênica e genética. Estas cepas foram sorogrupadas com os antissoros O tipo 1 e 4 e subtipadas após PFGE seguindo o protocolo preconizado pelo *Center for Disease Control and Prevention* e empregando as enzimas *ApaI* e *AscI*.

Das cepas, 132 (72,9%) pertenceram ao sorogrupo 1 e 49 (27,1%) ao sorogrupo 4. Com as enzimas *ApaI* e *AscI* foram obtidos, respectivamente, 30 e 28 perfis de macrorestrição diferentes. Os perfis de ambas as enzimas foram combinados obtendo-se 60 perfis combinados de macrorestrição. A combinação dos perfis de macrorestrição à sorologia permitiu separar as cepas em 8 subtipos e a distribuição destes subtipos na linha de processamento foi avaliada. Notou-se que um mesmo perfil de macrorestrição foi encontrado no salmão desde o início do processamento até o produto final, já embalado, utensílios e nas mãos de manipuladores. Também verificou-se que alguns perfis estavam adaptados ao ambiente de processamento e utensílios não sendo transmitidos ao produto. Na planta em questão há necessidade de aplicação inicialmente de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e posteriormente Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP)

Abstract

Listeria monocytogenes is a great concern for the public health and for the food industry, because it can cause serious illness such as meningitis, septicemia and abortion. Lots of studies in many countries, including Brazil, point to the frequent presence of *L. monocytogenes* in the fish industries. Molecular biology techniques have been applied to trace the contamination of *L. monocytogenes* and identify the sources of contamination of the food processing lines. One of them is the PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*), which is based on a genomic macrorestriction with low frequency restriction enzymes (*Sma*I, *Asc*I and *Apa*I), followed by a pulsed electrophoresis.

181 strains of *L. monocytogenes* were isolated from “gravlax” salmon processing line in several stages of the industrial processing, handworkers, environmental and food contact surfaces samples and the antigenic and genetic diversity were evaluated. They were serogrouped with antiserum O type 1 and 4, and subtyped using PFGE according to *Center for Disease Control and Prevention* protocol using the enzymes *Apa*I and *Asc*I. 132 strains (72,9%) belonged to serogroup 1, 49 (27,1%) to serogroup 4. Visual comparison for macrorestriction patterns revealed 30 distinct *Apa*I restriction endonuclease digestion profiles (REDP) and 28 *Asc*I REDP. When the composite profile from both enzymes was generated, there were 60 profiles. The combined macrorestriction profiles were joined to the serology resulting in 8 subtypes and the subtypes distribution along the processing line was evaluated. It's interesting to note that one specific profile found in the raw material was also found in different processing steps up to the final product (ready-to-eat "gravlax" salmon) and also in food contact and non food contact surfaces, as well as food handlers. Some profiles were well adapted to the processing environment and were not found in fish. Our results strongly suggest that this industry needs to apply the Good (GMP) and Analysis of Hazards and Critical Points of Control (HACCP) to produce safer products.

1. INTRODUÇÃO

A globalização e o crescimento do comércio internacional nos últimos anos têm feito dos pescados e derivados um dos mais importantes itens de comercialização (FARBER, 2000).

Como exemplo da expansão crescente deste mercado, podemos citar o aumento da importação de pescados por parte do Brasil, que no ano de 1997 alcançou a casa de 190.000 ton. (DESTRO, 2000) e em 2001 fechou o ano com um superávit na balança comercial de 22,6 milhões de dólares (INFRA-ESTRUTURA BRASIL, 2001).

Hoje, consumimos cerca de 800 toneladas de salmão fresco por mês, 20 vezes mais que no início dos anos 90 (36 a 40 toneladas). Nos mercados, feiras livres e supermercados, o seu preço, por vezes, gira em torno dos R\$ 17,00 – menos que os brasileiríssimos namorado e pintado (MERGUIZZO, 2001).

Por esta razão, diversos países têm estabelecido regulamentos para controlar a possível distribuição de microrganismos, ou de suas toxinas em pescados, que podem afetar a saúde do consumidor. Dentre os microrganismos de importância deve-se ressaltar a presença do gênero *Listeria*.

Na Inglaterra no ano de 1924, Murray *et al.* fizeram a primeira referência sobre *Listeria* quando observaram a morte de 6 coelhos por uma bactéria que não apresentava nenhuma característica dos gêneros já estabelecidos segundo o Manual Bacteriológico Determinativo de Bergey. A principal característica deste microrganismo era a grave leucocitose mononuclear que causava nos animais, sendo assim chamado de *Bacterium monocytogenes*. Em 1927, na África do Sul, Pirie também isolou um microrganismo o qual denominou de *Listerella hepatolytica* em homenagem a Lord Lister. Mais tarde descobriu-se que os microrganismos eram os mesmos e em 1939 foi denominado de *Listeria monocytogenes* (RYSER & MARTH, 1999).

O gênero *Listeria* atualmente contém 6 espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. grayi*. A identificação das diferentes espécies de *Listeria* é simples e pode ser feita avaliando-se a capacidade de fermentação dos carboidratos (D-manitol, D-xilose, ramnose), produção de hemolisina e reação CAMP (RYSER & MARTH, 1999). A reação CAMP é utilizada para a confirmação da β hemólise de *L. monocytogenes*, que é de difícil visualização. Uma cepa de *Staphylococcus aureus* é inoculada perpendicularmente à cepa de *L. monocytogenes* em ágar sangue. *S. aureus* produz metabólitos que vão estimular a hemólise de *L. monocytogenes*, facilitando desta forma a interpretação do resultado (VARNAM & EVANS, 1991).

Listeria é um bacilo curto, Gram-positivo, não esporulado, microaerófilo, produtor de catalase, não produtor de oxidase e móvel a 25°C devido à presença de flagelos peritríquios. Pode se multiplicar em uma ampla faixa de pH (4,5 - 9,2) e de temperatura (0 - 45°C), além disso tolera elevadas concentrações de sal. Pode sobreviver por longos períodos em alimentos congelados ou liofilizados (FARBER & PETERKIN, 1991).

L. monocytogenes é a espécie de maior preocupação em relação a doenças causadas por alimentos. Pode ser agrupada em 13 sorotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e e 7) de acordo com seus antígenos somáticos e flagelares (RYSER & MARTH, 1991). Os casos de listeriose são causados, na maioria das vezes, por cepas pertencentes ao sorogrupo 4, apesar de já terem sido isoladas cepas pertencentes ao sorogrupo 1/2 que foram ligadas à doença (LONCAREVIC *et al.*, 1998).

L. monocytogenes tem sido isolada de águas de rios e sedimentos, canais, lagos e águas das costas marítimas, portanto é mais do que natural encontrar este microrganismo associado a pescados e derivados (KARUNASUGAR, 2000).

Esta bactéria tornou-se um dos mais importantes patógenos veiculados por alimentos na década de 80 devido a eclosão de diversos surtos de listeriose humana (SHANK *et al.*, 1996). A transmissão de listeriose por alimento só foi demonstrada em 1981 durante um surto ocorrido no Canadá envolvendo 41 pessoas. O alimento

incriminado foi a salada tipo *coleslaw* produzida localmente. A origem da contaminação foi o estrume de ovelhas utilizado como fertilizante na produção de repolhos que, após a colheita, foram armazenados sob refrigeração até serem levados para o produtor das saladas, possibilitando desta forma a multiplicação da bactéria (SCHLECH *et al.*, 1983).

Em relação ao consumo de pescados, *L. monocytogenes* foi incriminada como agente responsável em alguns casos esporádicos de listeriose (FACINELLI *et al.*, 1989; FREDERIKSEN, 1991; MITCHELL, 1991; BAKER *et al.*, 1993; RIEDO *et al.*, 1994; ERICSSON *et al.*, 1997; FARBER *et al.*, 2000) e suspeitos de surtos que também envolviam pescados (LENON *et al.*, 1984; BRETT *et al.*, 1998; MIETTINEN *et al.*, 1999). Apesar da ingestão de pescados prontos para consumo ser alto em alguns países, como os escandinavos, a detecção de baixos níveis de *L. monocytogenes* (<100UFC/g), talvez explique porque há notícias de muitos casos e surtos de listeriose veiculados por estes alimentos. Técnicas mais aprimoradas têm permitido, nos últimos anos, a detecção mais freqüente de *L. monocytogenes*.

Não existem relatos no Brasil de casos de listeriose humana associados ao consumo de alimentos. Isto se deve provavelmente à falta de estrutura dos laboratórios que não incluem a pesquisa de *Listeria* como rotina. No estudo realizado por LANDGRAF *et al.* (1999) em um hospital da Grande São Paulo, 5 bebês apresentaram meningite por *L. monocytogenes*, ocorrendo 2 óbitos. Não pôde ser comprovada a fonte de contaminação, mas foi levantada a hipótese da alimentação das mães estar envolvida nos casos.

Em 1988 a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu que o consumo de alimentos contaminados seria a rota primária de transmissão de listeriose humana (ROCOURT, 1996).

Dados coletados nos surtos já ocorridos indicam que os pacientes com maiores riscos de contaminação por *L. monocytogenes* são: mulheres grávidas e seus fetos, pessoas que sofreram transplantes de órgãos, pacientes com câncer, indivíduos

com mais de 65 anos, portadores de HIV e pessoas com AIDS (ROCOURT, 1996). Porém existem casos de listeriose relatados na literatura, no qual a vítima não apresentava qualquer característica de predisposição citada. Na Inglaterra, em 1988, uma mulher apresentou um quadro de meningite, sendo que o mesmo sorotipo de *L. monocytogenes* foi isolado do queijo tipo frescal, de suas fezes e do líquido cérebro espinhal. Na amostra de queijo foram encontradas $3,0 - 5,0 \times 10^6$ UFC/ g de *L. monocytogenes*.

A listeriose em adultos saudáveis é assintomática ou apresenta sintomas de uma leve gripe, porém em pacientes da população de risco *L. monocytogenes* é capaz de invadir o epitélio do trato gastrointestinal e posteriormente invadir fagócitos, onde consegue sobreviver e se multiplicar. A partir daí pode chegar até o cérebro causando meningite, ou mesmo atravessar a barreira placentária atingindo o feto e causando nascimentos pré-maturos e abortos, além de poder causar uma infecção sistêmica (septicemia). Sua taxa de mortalidade é de 30%, sendo que dentro do grupo de risco esta taxa é de 75%. Está presente no trato gastrointestinal de cerca de 10% da população (NORRUNG, 2000).

Casos de listeriose não são tão comuns como os de salmonelose, porém as perdas econômicas associadas a cada caso são altas. Em um estudo feito nos Estados Unidos, estimou-se que anualmente há um gasto de aproximadamente 500 milhões de dólares com casos de listeriose, incluindo-se perdas de produtividade, custos médicos e seqüelas da doença. Também devem ser considerados os custos da indústria que teve seu produto incriminado, custos estes que vão desde o recolhimento e destruição de toda produção suspeita até mudanças na linha de produção ou mesmo fechamento da fábrica (ROBERTS & PINNER, 1990). Além disso estima-se um custo de US\$4.500.000,00 por ano em casos agudos e crônicos de listerioses (ERS, 2002).

De acordo com o *Food Safety and Inspection Service* (FSIS), nos Estados Unidos durante os anos de 2001 e 2002 ocorreram 25 e 34, respectivamente,

recolhimentos de diversos alimentos por suspeitas de estarem contaminados por *L. monocytogenes* (FSIS, 2002).

Nos Estados Unidos há um programa de monitoramento de doenças de origem alimentar (FOODNET) que abrange, atualmente, 8 estados americanos. Durante o ano de 2000, 101 casos de listeriose foram confirmados apesar de se acreditar que ocorram cerca de 2500 casos de listeriose por ano, com 499 mortes (CDC, 2001). O Departamento de Saúde Pública do Reino Unido confirmou 113 casos de listerioses somente no ano de 2000 (PHLS FOOD HYGIENE LABORATORY, 2001).

De acordo com ROCOURT *et al.* (2000) o aumento no número de surtos de listeriose é devido a aspectos demográficos e mudanças na forma de produção, processamento e estocagem de alimentos, principalmente no que diz respeito ao emprego da cadeia de frio que propicia a multiplicação de *Listeria*.

Os surtos de listeriose estão associados ao consumo de diversos alimentos entre eles laticínios, carnes e derivados, pescados e derivados e vegetais (McLAUHLIN, 1996). Segundo ROCOURT *et al.* (2000) e THAM *et al.* (2000), os alimentos de maior risco são os prontos para o consumo, com destaque para aqueles armazenados sob refrigeração por períodos longos, o que possibilita a multiplicação de *L. monocytogenes* permitindo que doses infectivas sejam atingidas. Além disto, estes produtos não sofrem nenhum aquecimento prévio antes de serem ingeridos.

L. monocytogenes pode sobreviver a processamentos como cura e defumação a frio, sendo destruída, entretanto, por tratamento térmico de 65°C por 20 minutos. Desta forma, é freqüentemente isolada de produtos como pescados defumados já que estes não passam por nenhum processo listericida, e têm uma longa vida de prateleira (4 a 12 semanas), tornando-se um alimento de risco para a população (THAM *et al.*, 2000).

O salmão "gravad" ou "gravlax" é feito de filés crus do peixe, que são submetidos a uma cura com açúcar, sal e pimenta, cobertos com "endro-dill" e colocados em embalagens plásticas em geladeira por 2 dias. Após este período, as embalagens são abertas e os filés, fatiados ou não, são transferidos para embalagens impermeáveis a oxigênio e armazenadas a 8°C, tendo um prazo de validade de até 6 semanas. A ocorrência de *L. monocytogenes* em 21-27% de salmão "gravad" foi relatada por LONCAREVIC *et al.* (1996).

Segundo JORDBREKERSVERK (1996), na Suécia o consumo deste tipo de salmão tem aumentado a cada ano que passa (1990-1Kg/percapita e em 1995 – 1,6Kg/percapita). Estes produtos representam um grande risco à população, por já terem sido correlacionados com casos de listeriose.

NILSSON *et al.* (1997), em um trabalho realizado com salmão defumado, verificaram o aumento de 5 ciclos logarítmicos na população de *L. monocytogenes* em apenas 9 dias de estocagem do produto a 5°C. Já SILVESTRE (2000) estudando o comportamento de *L. monocytogenes* em amostras de salmão "gravlax" naturalmente contaminadas verificou que o produto estocado a 8°C não propicia a multiplicação do microrganismo.

Devido a importância do microrganismo e do pouco conhecimento que se tem sobre o risco associado de *L. monocytogenes* aos pescados e sua implicação no comércio internacional destes produtos é que a *Food Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) reuniu especialistas da área para discutir e avaliar a importância de *Listeria* em pescados, incluindo aplicação de análise de risco, incidência, sobrevivência e desenvolvimento do microrganismo nos alimentos, além de recomendação de medidas de prevenção e controle de contaminação por parte das plantas processadoras. Parte destas avaliações foi publicada num volume especial do *International Journal of Food Microbiology* (v.62, n.3, 2000) e as deliberações deste grupo foram compiladas no documento FAO Fishery Report n° 604 (1999).

Uma vez que a dose infectante mínima de *L. monocytogenes* não é conhecida, diversos pesquisadores têm buscado formas para estimar matematicamente estes valores. BUCHANAN *et al.* (1997) foram um dos pioneiros nestas modelagens, mas chegaram a conclusão de que para se fazer uma estimativa confiável da dose infectante mínima deste microrganismo há necessidade de um número maior de dados epidemiológicos.

SKOVGAARD (1988) relatou em uma revisão que a dose infectiva pode ser considerada baixa, como poucas centenas de UFC/g de alimento em pessoas susceptíveis.

Nos últimos 2 anos um grupo de especialistas convocados pela FAO-OMS vêm trabalhando na avaliação de risco (*risk assessment*) de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo. Os documentos referentes a este estudo estão em fase final de elaboração (FAO, comunicação pessoal).

Em muitos países têm-se estabelecido critérios ou recomendações para níveis toleráveis de *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo. Alguns países, como Estados Unidos e Itália, exigem ausência de *L. monocytogenes* em 25 g de produto, enquanto países europeus como Alemanha, Holanda e França admitem presença de até 100 UFC/g no produto final. Canadá e Dinamarca exigem ausência em 25g de produto somente para alimentos que apresentam uma longa vida de prateleira ou que já estiveram ligados a surtos, e para outros tolera até 100 UFC/g (GRAVANI, 1999). De acordo com a legislação em vigor no Brasil, a pesquisa de *L. monocytogenes* só é obrigatória para queijos de umidade > 36%, sendo estabelecida sua ausência em 25 g de produto (BRASIL, 2001).

Por serem contaminantes primários de superfícies, uma vez aderidos, microrganismos como *Listeria* têm a capacidade de formar biofilmes, dificultando sua remoção mesmo que sejam adotadas Boas Práticas de Fabricação. BLACKMAN *et al.* (1996) realizaram um experimento para avaliar a capacidade de formação de biofilme por *L. monocytogenes* em diversos tipos de materiais (Teflon[®], aço, nylon e

poliéster) empregados em linha de processamento de alimentos. Foi observado que o microrganismo é capaz de formar biofilmes tanto em superfícies hidrofóbicas (Teflon[®]) como hidrofílicas (aço), principalmente se resíduos de alimentos estiverem presentes. Além disso foi constatado um crescimento deste biofilme que chegou a cobrir 40% da superfície em 7 dias.

Em um trabalho realizado por THAM *et al.* (2000) cepas de *L. monocytogenes* foram isoladas da máquina embaladora de uma planta processadora de truta "gravad", sendo os mesmos clones isolados de produtos finais e de pacientes que apresentavam listeriose. Não se sabe quando a planta processadora tornou-se contaminada, mas os mesmos clones já tinham sido isolados durante uma checagem de rotina há cerca de 6 meses antes do ocorrido, mostrando que o microrganismo pode ficar como uma flora residente por um longo período.

Existe contradição com relação a principal fonte de *L. monocytogenes* em plantas processadoras de pescados. Alguns estudos mostraram que superfícies de peixes frescos e congelados são fontes primárias de contaminação de *L. monocytogenes*, e sendo que durante as etapas de produção: filetagem, lavagem e salga, ocorre o contato com os equipamentos e superfícies, transferindo a contaminação para estes. (HARTEMINK & GEORGSSON, 1991). Esta poderia ser removida se procedimentos de limpeza e sanificação adequados fossem seguidos, entretanto a recontaminação ocorre assim que o processamento é novamente iniciado (EKLUND *et al.*, 1995). Pesquisas realizadas no Brasil por DESTRO *et al.* (1996) reforçam a importância da matéria prima como fonte de contaminação do produto final. Eles verificaram que em uma planta processadora de camarão, as superfícies de equipamentos, utensílios e o ambiente não foram importantes para a contaminação do produto final pois foram encontradas nestes cepas de *L. monocytogenes* com o mesmo perfil molecular das cepas da matéria prima.

Já trabalhos desenvolvidos por RØRVIK *et al.* (1995) e RØRVIK *et al.* (1997) indicam que a matéria prima não é a fonte de contaminação do produto final (salmão defumado a frio) e que um reservatório de *L. monocytogenes* poderia estar

estabelecido na planta processadora. Resultados obtidos por AUTIO *et al.* (1999) reforçam este ponto de vista, uma vez que eles encontraram no produto final cepas de *L. monocytogenes* com perfil PFGE diferente daqueles da matéria prima. Na Dinamarca (HUSS *et al.*, 2000) resultados também indicam que a principal fonte de contaminação de pescados defumados são os equipamentos que abrigam cepas de *L. monocytogenes* de tipos específicos que estariam adaptadas ao ambiente de processamento.

Em um estudo realizado na Finlândia por MIETTINEN *et al.* (2001) avaliando linhas de produção de pescados, constatou-se que em 65% das plantas ocorreu contaminação por *Listeria* spp, sendo que um terço destas cepas foram identificadas como *L. monocytogenes*. Já nos Estados Unidos, HOFFMAN *et al.* (2003) não observaram nenhuma correlação entre a presença de *Listeria* spp e *L. monocytogenes*, portanto não se pode inferir que a presença de cepas do gênero *Listeria* significa uma preocupação naquela determinada linha de processamento.

Trabalhos desenvolvidos em diversos países, bem como no Brasil, indicam que a presença de *L. monocytogenes* nas indústrias processadoras de pescado é freqüente (HOFER & RIBEIRO, 1990; JEMMI & KEUSCH, 1994; EKLUND *et al.*, 1995; DESTRO *et al.*, 1996; AUTIO *et al.*, 1999; SILVESTRE, 2000).

Com a finalidade de monitorar a contaminação por *L. monocytogenes*, ou outros microrganismos, em plantas processadoras de alimentos e identificar as fontes de contaminação do produto têm-se empregado técnicas de biologia molecular. A aplicação destas técnicas tem crescido muito nos últimos anos principalmente por representarem uma nova geração de métodos mais rápidos e precisos, baseados em informações contidas no material genético dos microrganismos e que podem ser usadas tanto para detecção quanto para sua tipagem (VANNE *et al.*, 1996).

Vários critérios são utilizados para avaliar os métodos de tipagem, tais como: tipabilidade, reprodutibilidade, poder discriminatório, facilidade de realização e interpretação. Tipabilidade refere-se a capacidade do método de caracterizar uma

determinada amostra. Reprodutibilidade é a habilidade de um método fornecer o mesmo resultado quando a amostra é testada repetidamente por pesquisadores e laboratórios diferentes em tempos diferentes. Baixa reprodutibilidade pode ser reflexo de variações técnicas no método ou de fatores biológicos da amostra como consequência de repiques sucessivos, extensão do tempo e condições de armazenamento. Poder discriminatório refere-se à habilidade do método de distinguir cepas epidemiologicamente não relacionadas. Frequentemente os métodos fenotípicos apresentam menor poder discriminatório que métodos genotípicos. A facilidade de realização reflete o custo do equipamento e reagentes, a complexidade técnica do método e os esforços necessários para aprender e implantar a técnica no laboratório. A facilidade de interpretação refere-se aos esforços e experiência necessários para obter resultados de tipagem confiáveis e úteis (ARBEIT, 1995; TENOVER *et al.*, 1997).

O uso de métodos como a PCR (*Polymerase Chain Reaction* - reação de polimerização em cadeia) para a detecção de *L. monocytogenes* em alimentos tem sido descrito por diversos autores, no entanto não se mostraram muito sensíveis (ERICSSON & STALHANDSKE, 1997; RODRIGUES, 1999). Já para a subtipagem de microrganismos eles têm sido empregados com sucesso (GIOVANNACCI *et al.*, 1999; GRAVESEN *et al.*, 2000; ANDRIGHETO *et al.*, 2000).

O emprego de outros métodos moleculares para a subtipagem de microrganismos também tem sido recomendada. PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – eletroforese em gel de campo pulsado), desenvolvido por SCHWARTZ & CANTOR (1984), consiste em uma macrorestrição genômica, através da utilização de enzima de restrição de baixa frequência de corte, como a *SmaI*, *AscI* e *ApaI*, seguida de uma eletroforese em gel de agarose em que a orientação do campo elétrico através do gel é modificada periodicamente (*pulsed*). Devido a estas modificações realizadas na orientação do campo elétrico do sistema de eletroforese é possível separar fragmentos grandes de DNA, até mesmo fragmentos maiores que 1Mb (ARBEIT, 1995).

Quando se trabalha com fragmentos de DNA maiores que 500Kb é necessário proteger essas moléculas de quebras mecânicas e manter o DNA íntegro durante o processo de extração. Para isto cada amostra bacteriana é embebida em gel de agarose que protege o DNA de quebras, mas permite um fluxo livre das soluções necessárias para a lise e digestão da célula e do DNA. Estas amostras são tratadas com detergentes e concentrações elevadas de EDTA para inibir a atividade de nucleases. A proteinase K, também empregada, é capaz de digerir proteínas celulares e enzimas endógenas tornando-as assim incapazes de degradar ou modificar o DNA. O material liberado desta digestão pode se difundir para fora da agarose durante as lavagens, enquanto o DNA mantém-se preso, podendo então ser digerido com as enzimas de restrição adequadas (BIRREN & LAI, 1993). Esta técnica tem sido utilizada por pesquisadores tanto da microbiologia clínica quanto de alimentos e tem como principal vantagem a alta reprodutibilidade dos perfis genéticos encontrados.

A PFGE tem sido utilizada com muito sucesso para analisar a distribuição de cepas de *L. monocytogenes* em plantas de processamento de alimentos (JAQUET *et al.*, 1995; DESTRO *et al.*, 1996; UNNERSTAD *et al.*, 1996; ERICSSON *et al.*, 1997; GIOVANACCI *et al.*, 1999).

A combinação de métodos tradicionais de tipagem, fagotipagem e sorotipagem com a PFGE possibilitou uma melhor caracterização de cepas de *L. monocytogenes* provenientes de isolados clínicos e de alimentos, ajudando na investigação epidemiológica da transmissão alimentar de listeriose humana (PEREIRA *et al.*, 1994).

BROSCH *et al.* (1991) utilizaram-se da técnica de PFGE para tipar bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo a *L. monocytogenes*, e verificaram ser esta mais eficaz que outras técnicas moleculares.

PROCTOR *et al.* (1995) utilizaram PFGE para relacionar casos esporádicos de listeriose, ocorridos em diversos locais nos Estados Unidos, com a contaminação

de leite achocolatado por *L. monocytogenes*. Assim puderam caracterizar a ocorrência de um surto.

BROSCH *et al.* (1994) sugerem o emprego da técnica de PFGE em substituição à sorotipagem de cepas de *L. monocytogenes*, uma vez que os antissoros não se encontram disponíveis na maioria dos laboratórios.

NAKAMA *et al.* (1998), através do emprego da PFGE, puderam correlacionar casos de listeriose ocorridos no Japão com aqueles ocorridos na Califórnia em 1985 e na Suíça no período de 1983-1987. Eles verificaram que havia um clone específico de *L. monocytogenes* comum aos diferentes surtos.

KEROUANTON *et al.* (1998) compararam cinco métodos: sorotipagem, RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), PFGE, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) de DNA ribossômico e zimotipagem para se fazer um estudo epidemiológico de *L. monocytogenes* e chegaram a conclusão de que PFGE mostrou-se muito eficaz.

Em um trabalho desenvolvido por GRAVESEN *et al.* (2000) compararam-se 3 métodos para diferenciar cepas de *L. monocytogenes*: RAPD, PFGE e ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Os resultados foram analisados através do cálculo de um índice numérico de discriminação, concluindo assim que a técnica de PFGE apresentou o melhor desempenho.

DESTRO *et al.* (1996) mostraram a importância prática da utilização da PFGE como ferramenta no monitoramento da contaminação por *L. monocytogenes* de planta processadora de camarões.

Na França, GIOVANNACCI *et al.* (1999) utilizaram a PFGE, além de outras técnicas moleculares, para traçar a disseminação de *L. monocytogenes* em abatedouros e locais de corte de suínos. Eles verificaram que PFGE foi tão eficiente quanto RAPD na subtipagem dos isolados.

Um estudo realizado por MIETTINEM *et al.* (1999) na Finlândia mostrou a importância da caracterização através de PFGE de cepas de *L. monocytogenes* encontradas em uma linha de produção de sorvetes. Eles verificaram que a técnica é útil na identificação de focos de contaminação por este microrganismo e assim tornar possível sua erradicação.

Na Itália, POURSHABAN *et al.* (2000), utilizaram a PFGE para subtipar cepas de *L. monocytogenes* em linhas de produção de molhos, afim de traçar a disseminação deste microrganismo na planta. Após estes estudo, pode-se iniciar uma redução desta contaminação no produto final.

SENCZEK *et al.* (2000), na Suíça, avaliaram as cepas de *Listeria* isoladas durante 2 anos em uma planta processadora de presunto. Foram coletadas amostras em 3 áreas diferentes e através da técnica de PFGE eles verificaram que ocorria contaminação cruzada entre os produtos e o ambiente de processamento.

Apesar da existência de todos estes trabalhos empregando a PFGE, não existe uma forma padronizada de se realizar a análise e/ou de se avaliar os resultados o que dificulta a comparação dos dados obtidos.

A fim de facilitar as comparações o CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) americano vem sugerindo a utilização de uma metodologia padronizada para a realização da PFGE e da avaliação dos resultados. Com isto, estes resultados podem ser encaminhados a um banco de dados e comparados aos lá existentes permitindo um estudo epidemiológico mais abrangente (GRAVES & SWAMINATHAN, 2001).

2. OBJETIVOS

- A) Verificar a diversidade antigênica e genética das cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de produção de salmão "gravlax".
- B) Correlacionar a diversidade genética das cepas de *L. monocytogenes* com sua distribuição na linha de processamento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CEPAS UTILIZADAS

Foram utilizadas 181 cepas de *L. monocytogenes* isoladas a partir de amostras de salmão "gravlax" colhidas nas diferentes etapas do processamento, além de amostras de manipuladores, ambientes e utensílios, coletadas em uma usina de processamento industrial de São Paulo (SILVESTRE, 2000). As cepas foram escolhidas aleatoriamente de um total de 429 cepas de modo a se obter entre duas e oito cepas de cada ponto de coleta, representativas de diferentes datas de processamento. Uma cepa de *Salmonella* Typhi (ATCC 14028) e uma cepa de *Escherichia coli* (ATCC 8739) pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, foram empregadas como grupo externo (*outgroup*). Além disso também foram utilizadas uma cepa padrão de *L. monocytogenes* (H2446) e uma cepa de *L. innocua* de origem alimentar.

Nas tabelas 1 e 2 estão apresentadas a identificação das cepas de *L. monocytogenes* analisadas e nas figuras 1 e 2 a localização do ponto de coleta das amostras.

Tabela 1. Origem das 79 cepas de *L. monocytogenes* isoladas das amostras de salmão (S) coletadas em uma linha de processamento industrial de salmão “gravlax”.

Ponto de coleta	Tipo de amostra	Etapas de processamento	Total de cepas	Cepas
S1	Salmão fresco	Recepção	8	1S1-8S1
S2	Salmão salgado	Salga seca	8	1S2-8S2
S3	Salmão lavado	Lavagem	8	1S3-8S3
S4	Salmão c/ ingred. cura	Cura	6	1S4-6S4
S5	Salmão curado	Pulverização do jerez	5	1S5-5S5
S6	Salmão c/ pele	Maturação	8	1S6-8S6
S7	Salmão s/ pele	Retirada da pele	8	1S7-8S7
S8	Salmão fatiado	Fatiamento	8	1S8-8S8
S9	Salmão embalado	Embalagem à vácuo	6	1S9-6S9
S10	Salmão embalado resfriado	Refrigeração	6	1S10-6S10
S11	Salmão embalado congelado	Congelamento	8	1S11-8S11

Figura 1. Representação esquemática do processamento industrial de salmão “gravlax”, indicando os pontos de coleta das amostras do salmão (S).

Tabela 2. Origem das 102 cepas de *L. monocytogenes* isoladas das amostras de utensílios (U), ambiente (A) e manipulador (M) coletadas em uma linha de processamento industrial de salmão “gravlax”.

Ponto de coleta	Tipo de amostra	Etapa de processamento	Total de cepas	Cepas
A1	Canaleta da sala de recepção	Recepção	8	1A1-8A1
A2	Chão da sala de recepção	Recepção	6	1A2-6A2
A3	Chão da sala de lavagem	Retirada de sais	6	1A3-6A3
A4	Canaleta da sala de lavagem	Retirada de sais	6	1A4-6A4
A5	Chão da câmara fria	Maturação	6	1A5-6A5
A6	Chão da sala de fatiamento	Fatiamento	6	1A6-6A6
A7	Canaleta da sala de fatiamento	Fatiamento	6	1A7-6A7
U1	Faca filetagem	Recepção	6	1U1-6U1
U2	Mesa filetagem	Recepção	3	1U2-3U2
U3	Mesa de salga	Salga seca	5	1U3-5U3
U4	Caixa de salga	Salga seca	6	1U4-6U4
U5	Mesa de retirada de pele	Retirada da pele	2	1U5-2U5
U6	Prato de pesagem	Porcionamento	6	1U6-6U6
U7	Carrinho	Embalagem	5	1U7-5U7
M1	Limpeza e filetagem	Recepção	6	1M1-6M1
M2	Retirada de espinho	Recepção	6	1M2-6M2
M3	Salga	Salga seca	3	1M3-3M3
M4	Pulverização do jerez	Pulverização do jerez	3	1M4-3M4
M5	Fatiamento	Fatiamento	7	1M5-7M5

Figura 2. Representação esquemática do processamento industrial do salmão “gravlax”, indicando os pontos de coleta das amostras de manipuladores (M), ambientes (A) e de utensílios e equipamentos (U).

3.2. MÉTODO

3.2.1. MANUTENÇÃO DAS CEPAS

As cepas de *L. monocytogenes* estavam congeladas à -70°C em 0,8mL de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI-Difco) adicionado de 0,2mL de glicerol. Antes de serem usadas foram ativadas e tiveram sua pureza verificada.

Para isso as culturas foram transferidas para caldo soja tripticase (Difco) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (Difco) (TSB-YE) e incubadas a 37°C por 24h. Após a turvação do meio de cultura as mesmas foram semeadas por esgotamento em superfície em ágar soja tripticase (Difco) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE) e incubadas a 37°C por 24h. Verificou-se a pureza da cultura empregando-se iluminação transmitida. Uma colônia isolada foi transferida para ágar conservação, que após incubação a $37^{\circ}\text{C}/24\text{h}$, foi mantido à 4°C até o dia do início da tipagem por PFGE.

Na Figura 3 tem-se a representação esquemática das etapas de ativação e verificação da pureza.

Figura 3. Representação esquemática das etapas de ativação e purificação das cepas de *L. monocytogenes* para serem usadas na tipagem por PFGE. BHI (caldo infusão cérebro coração); TSB-YE (caldo soja tripticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura); TSA-YE (ágar soja tripticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura).

3.2.2. PFGE

As cepas foram tipadas empregando-se a técnica de PFGE seguindo o protocolo preconizado pelo CDC (GRAVES & SWAMINATHAN, 2001) descrito a seguir:

Suspensão de células de *L. monocytogenes*

A cepa foi inoculada superficialmente em placas contendo ágar BHI e incubada por 24h a 37°C. O crescimento foi recolhido com auxílio de alça e transferido para 3 mL de tampão TE [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (Pharmacia) pH8,0]. Determinou-se a absorbância a 610nm desta suspensão (Ultrospec 2000 – Pharmacia) e a densidade óptica foi corrigida para 1,25-1,35. Uma alíquota de 240µL desta suspensão foi transferida para tubo de centrifuga de 1,5 mL (Axygen) contendo 60µL de solução de lisozima (10 mg/mL) (Pharmacia) e os tubos foram incubados em banho maria a 37°C por cerca de 10 min (Figura 4).

Preparação dos blocos de agarose

Ao tubo de suspensão de células foram adicionados 300µL da solução de SSP [1,2% SeaKem Gold Agarose (FMC Bioproducts), 1% Dodecil Sulfato de Sódio (Sigma), 0,2 mg/ml proteinase K (Pharmacia)]. Após homogeneização, volumes adequados foram distribuídos nos moldes (BioRad) para formação dos blocos (Figura 4).

Lise

Os blocos de agarose já solidificados foram transferidos para tubos cônicos tipo Falcon de 50 mL, e 4 mL de solução de lise [50mM Tris-HCl, 50mM EDTA pH 8,0, 1% Sarcosina (Sigma) e 0,15mg/mL de Proteinase K] foram adicionados. Os tubos foram incubados com agitação de 175 rpm por 2 horas a 54°C (Figura 4).

Restrição

Após 2 lavagens de 10 min cada com água estéril aquecida a 50°C e 4 lavagens, de 15 min cada, com tampão TE estéril também aquecido a 50°C foram cortadas “fatias” dos blocos (aproximadamente 1/3 do tamanho original) que foram submetidas à digestão com uma das enzimas de restrição. Para a enzima *ApaI* (Pharmacia) empregou-se a concentração de 160U/fatia e para *AscI* (New England Biolabs) 25U/fatia. Os tubos foram incubados a 37°C por 18-24 horas para ambas as enzimas (Figura 4).

Eletroforese

Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose [Agarose Seakem Gold 1% em tampão TBE (0,9M Tris base, 0,9M ácido bórico, 0,02M EDTA)] empregando-se o aparelho CHEF-DR III (BioRad) com os seguintes parâmetros: $t = 20h$, $200v$, ângulo = 120° , gradiente = $6v/cm$, temperatura do tampão = $14^\circ C$. O gel foi corado em solução de brometo de etídio 5mg/mL (Pharmacia) e examinado sob luz ultra-violeta. A imagem foi registrada com auxílio do Photo Documentation System (Vilber Lourmat). A cepa padrão (*L. monocytogenes* H2446) também foi submetida a digestão e foi utilizada como controle. Como marcador de peso molecular utilizou-se Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs).

Figura 4. Representação esquemática do preparo dos plugs de células de *L. monocytogenes*, restrição e eletroforese em gel de campo pulsado.

3.2.3. TIPAGEM SOROLÓGICA

As cepas de *L. monocytogenes* foram sorogrupadas com os antissoros O tipos 1 e 4 (Difco). Cepas selecionadas foram tipadas com antissoro específico *Denka Seiken* (Tóquio, Japão) para *Listeria*. Para ambos os soros utilizou-se as instruções dos fabricantes.

3.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os padrões gerados com cada enzima de restrição pela PFGE foram comparados visualmente e as cepas agrupadas conforme seus perfis. Os pesos moleculares das bandas foram calculados com o Sistema EDAS 120 (Eastman Kodak, USA).

Os resultados obtidos com cada enzima foram combinados entre si e a correlação entre os perfis foi verificada com auxílio do programa NTSYSpc 2.0 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (Exeter Software, USA) usando-se o coeficiente de similaridade de Dice (DICE, 1945). O mesmo programa foi usado para construir um dendrograma baseado na análise de *clusters* UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average*) (SNEATH & SOKAL, 1973).

Os *clusters* formados pelos perfis combinados de PFGE foram também relacionados aos resultados da tipagem sorológica. O índice de discriminação D (HUNTER & GASTON, 1988) foi determinado para avaliar o poder discriminatório da tipagem. A diversidade genética das cepas foi então correlacionada com a distribuição de *L. monocytogenes* na linha de processamento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 181 cepas de *L. monocytogenes* foram sorotipadas com os antissoros O tipo 1 e 4 (Difco). Destas, 132 (72,9%) pertenceram ao sorogrupo 1, 49 (27,1%) ao sorogrupo 4 e 15 (8,3%) aglutinaram ambos os soros. Estas 15 cepas foram submetidas a sorotipagem complementar empregando-se os antissoros somáticos e flagelares da Denka Seiken sendo que 14 (93,3%) pertenceram ao sorotipo 1/2b e uma, a cepa 3U4, ao sorotipo 4b. Na tabela 3 encontram-se os resultados obtidos para os sorogrupos. Os resultados da sorologia estão em conformidade com os apresentados por outros pesquisadores (RORVIK *et al.*, 1995; JOHANSSON *et al.*, 1999; DAUPHIN *et al.*, 2001) que relatam o predomínio de cepas do sorogrupo 1 em amostras de salmão e em amostras de ambiente de processamento (FARBER & PETERKIN, 1991; DESTRO *et al.*, 1996; ANDRIGHETO, 2000). Estes autores destacam ainda que *L. monocytogenes* do sorogrupo 4 está mais relacionada a surtos, e neste estudo foram encontradas cepas deste sorogrupo nas amostras obtidas do produto final nas etapas de estocagem, tanto em amostras resfriadas (3 cepas) como congeladas (6 cepas), demonstrando a importância deste produto como veículo potencial de infecção por *L. monocytogenes*.

Tabela 3. Grupos sorológicos das 181 cepas de *L. monocytogenes* empregadas neste estudo.

Sorogrupo	Cepas ^a	Total de cepas
1	1S1 2S1 3S1 4S1 5S1 6S1 7S1 8S1 4S2 5S2 4S3 5S3^b 6S3 7S3 8S3 2S4 3S4 4S4 5S4 1S6 2S6 4S6 5S6 6S6 7S6 8S6 1S7 2S7 3S7 4S7 7S7 8S7 2S8 3S8 4S8 7S8 8S8 1S9 2S9 3S9 4S9 5S9 6S9 1S10 2S10 3S10 1S11 2S11 1U1 2U1 3U1 4U1 5U1 6U1 1U2 2U2 1U3 2U3 3U3 4U3 5U3 1U5 2U5 3U5 4U5 5U5 6U5 1U6 2U6 3U6 4U6 5U6 1U7 2U7 1A1 2A1 3A1 4A1 8A1 1A2 2A2 3A2 5A2 6A2 1A3 2A3 3A3 4A3 5A3 6A3 1A4 2A4 3A4 4A4 5A4 6A4 4A5 5A5 6A5 1A6 2A6 3A6 4A6 5A6 6A6 1A7 2A7 3A7 4A7 5A7 6A7 1M1 2M1 3M1 4M1 5M1 6M1 2M2 3M2 4M2 5M2 6M2 1M3 2M3 3M3 1M5 2M5 3M5 4M5 5M5 6M5 7M5	132
4	1S2 2S2 3S2 5S2 6S2 7S2 8S2 1S3 2S3 3S3 1S4 6S4 1S5 2S5 3S5 4S5 5S5 3S6 5S7 6S7 1S8 5S8 6S8 4S10 5S10 6S10 3S11 4S11 5S11 6S11 7S11 8S11 1U4 2U4 3U4^c 4U4 5U4 6U4 5A1 6A1 7A1 4A2 1A5 2A5 3A5 1M2 1M4 2M4 3M4	49

^a Consultar tabelas 1 e 2 para identificação das cepas.

^b Cepas do sorotipo 1/2b

^c Cepas do sorotipo 4b

Do total de 181 cepas de *L. monocytogenes* inicialmente selecionadas, todas (100%) foram subtipáveis pela técnica de PFGE após a digestão com as enzimas *ApaI* e *AscI*, sendo 79 provenientes de produto, 33 de utensílios, 44 de ambiente e 25 de manipulador (Tabelas 1 e 2).

Com as enzimas *ApaI* e *AscI* foram obtidos, respectivamente, 30 e 28 perfis PFGE diferentes para as cepas de *L. monocytogenes*. Estes perfis estão apresentados nas figuras 5, 6, 8 e 9.

Os 30 perfis PFGE gerados com a enzima *ApaI* apresentaram de 12 a 17 bandas, com pesos moleculares variando de 16 kb a 423 Kb (Figuras 5, 6 e 7). É importante ressaltar que em algumas cepas observou-se bandas com pesos moleculares menores que 16 Kb, porém estas foram desconsideradas, já que seus pesos moleculares eram muito imprecisos. A banda de 224 Kb esteve presente em 83% (25/30) dos perfis gerados, já as bandas de 98Kb e 185 Kb estiveram presentes em 63% (19/30) e 60% (18/30), respectivamente dos perfis gerados para as cepas de *L. monocytogenes* (Figuras 5, 6 e 7). Esta última banda estava também presente no perfil gerado para *Salmonella* Typhi. A cada perfil de DNA gerado pela PFGE pertenceram de 1 a 26 cepas e os perfis com maior número de cepas foram P21, P11 e P30, com 26 (14%), 18 (10%), e 15 (8%) cepas, respectivamente (Tabela 4).

Com a enzima de restrição *AscI* foram obtidos 28 perfis de PFGE que apresentaram entre 7 a 14 bandas, com pesos moleculares variando de 23 Kb a 600 Kb (Figuras 8, 9 e 10). Como relatado para a enzima *ApaI*, com a *AscI* também foram observadas bandas com peso molecular menores que 15 Kb, que receberam o mesmo tratamento anteriormente descrito. A banda de 598 Kb esteve presente em 100% (28/28) dos perfis gerados, inclusive no perfil de *Listeria innocua*, mas não estava presente no perfil gerado com a cepa de *Salmonella* Typhi. Esta banda pode ser um marcador para o gênero *Listeria*. As bandas de 409 Kb, 239 Kb, 61 Kb e 47 Kb estiveram presentes em 19 (67,9%), 20 (95%), 18 (60%), 19 (67,9%), respectivamente, dos perfis gerados para as cepas de *L. monocytogenes* (Figuras 8, 9 e 10). A cada perfil de DNA pertenceram de 1 a 34 cepas e os perfis com maior número de cepas foram C18 (34 cepas, 18,8%), C13 (25 cepas, 13,8%), C1 e C7

(ambos com 20 cepas, 11,1% cada) e C19 (16 cepas, 8,8%). Estes cinco perfis juntos reuniram 115 cepas (63,6%) (Tabela 5).

A cepa de *Escherichia coli* escolhida para este estudo apresentou um número elevado de sítios de restrição inviabilizando a análise dos resultados.

Figura 5. Perfis PFGE obtidos com a enzima de restrição *ApaI* para as 181 cepas de *L. monocytogenes* (P1 a P17) isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax”. PM = marcador de peso molecular lambda ladder (New England Biolabs), P = *L. monocytogenes* H2446.

Figura 6. Perfis PFGE obtidos com a enzima de restrição *ApaI* para as 181 cepas de *L. monocytogenes* (P18 a P30) isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax”. PM = marcador de peso molecular lambda ladder (New England Biolabs) , P = *L. monocytogenes* H2446, EC = *Escherichia coli*, SI = *Salmonella* Typhi, LI = *Listeria innocua*

Figura 7. Representação esquemática dos padrões de bandas dos perfis PFGE obtidos com a enzima de restrição *ApaI* para as 181 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax” e para a cepa de *S. Typhi*.

Tabela 4. Distribuição das 181 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax”, conforme os 30 perfis PFGE gerados com a enzima *ApaI*.

Perfil <i>ApaI</i>	Cepas ^a	Total de cepas
P1	3S1 1S4 2S4 3S4 4S4 7S8 1S9 2S9	8
P2	1S1 2S1 4S1 5S1 6S1 7S1 8S1 4S2 3S10	9
P3	1S2	1
P4	2S2 3S2 7S2 8S2 4S10 5S10 6S10 1M4 2M4 3M4	10
P5	5S2 6S2 1S3 2S3 3S3 6S7 5S8 6S8	8
P6	7S6 7S7 8S7	3
P7	4S3 7S3 8S3 4S6 5S6 6S6 8S6 4M1 5M1 6M1	10
P8	5S4 6S4	2
P9	1S5 2S5 3S5 4S5 5S5 1U4 2U4 3U4 4U4 5U4 6U4	11
P10	3S6	1
P11	1S6 2S6 1S7 2S7 3S7 4S7 2S8 3S8 4S8 1S11 2S11 1M2 2M2 3M2 4M2 5M2 6M2 1M5	18
P12	5S7	1
P13	1S8	1
P14	8S8	1
P15	3S9 4S9 5S9 6S9	4
P16	1S10	1
P17	2S10 1U6 2U6 4U6 5U6	5
P18	3S11	1
P19	4S11 5S11 6S11 7S11 8S11	5
P20	1U2 2U2 3U2 3A1 6A1 1A3 2A3	7
P21	1U3 2U3 3U6 4A1 5A1 7A1 8A1 3A2 4A2 5A2 6A2 3A3 5A3 6A3 1A4 2A4 3A4 4A4 5A4 6A4 1A5 2A5 3A5 4A5 5A5 6A5	26
P22	3U3 4U3 5U3 1A2 2A2 1A6 2A6 3A6 4A6 5A6 6A6	11
P23	1U5 2U5 3U5 4U5 5U5 6U5	6
P24	1U7 2U7	2
P25	1A7 2A7 3A7	3
P26	4A7 5A7 6A7	3
P27	2M5 7M5	2
P28	3M5 4M5 5M5 6M5	4
P29	5S3 6S3	2
P30	1U1 2U1 3U1 4U1 5U1 6U1 1A1 2A1 4A3 1M1 2M1 3M1 1M3 2M3 3M3	15

^a Consultar tabelas 1 e 2 para identificação da origem das cepas.

Figura 8. Perfis PFGE obtidos com a enzima de restrição *AscI* para as 181 cepas de *L. monocytogenes* (C1 a C15) isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax”. PM = marcador de peso molecular lambda ladder (New England Biolabs), P = *L. monocytogenes* H2446.

Figura 9. Perfis PFGE obtidos com a enzima de restrição *ApaI* para as 181 cepas de *L. monocytogenes* (C16 a C28) isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax”. PM = marcador de peso molecular lambda ladder (New England Biolabs), P = *L. monocytogenes* H2446, EC = *Escherichia coli*, SI = *Salmonella* Typhi, LI = *Listeria innocua*

Figura 10. Representação esquemática dos padrões de bandas dos perfis PFGE obtidos com a enzima de restrição *AscI* para as 181 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax” e para a cepa de *S. Typhi*.

Tabela 5. Distribuição das 181 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax”, conforme os 28 perfis PFGE gerados com a enzima *AscI*.

Perfil <i>AscI</i>	Cepas ^a	Total de cepas
C1	3S1 4S1 5S1 8S1 8S7 1S9 2S9 1U5 2U5 3U5 4U5 5U5 6U5 1M5 2M5 3M5 4M5 5M5 6M5 7M5	20
C2	6S1 7S1 2S4 3S4 4S4 5S4 7S6 7S7 7S8	9
C3	1S2 3S6	2
C4	2S2 3S2	2
C5	4S2	1
C6	5S2 6S2 1S3 2S3 3S3 6S7 6S10 5S10	8
C7	7S2 8S2 1S4 1S5 2S5 3S5 4S5 5S5 5S7 4S11 5S11 6S11 7S11 8S11 1U4 2U4 3U4 4U4 5U4 6U4	20
C8	5S3 6S3	2
C9	4S3 7S3 8S3	3
C10	6S4	1
C11	5S8 6S8	2
C12	1S1 2S1 1U3 2U3 3A1 6A1	6
C13	2S8 3S8 4S8 3U3 4U3 5U3 1U6 2U6 4U6 5U6 1A6 2A6 3A6 4A6 5A6 6A6 1A7 2A7 3A7 4A7 5A7 6A7 1M3 2M3 3M3	25
C14	4S6 5S6 6S6 8S6 4M1 6M1	6
C15	3S11	1
C16	8S8	1
C17	1S8	1
C18	2S10 1U1 2U1 3U1 4U1 5U1 6U1 1A1 2A1 4A1 5A1 7A1 8A1 1A4 2A4 3A4 4A4 5A4 6A4 1A5 2A5 3A5 4A5 5A5 6A5 1M1 2M1 3M1 1M2 2M2 3M2 4M2 5M2 6M2	34
C19	1S6 2S6 1S7 2S7 3S7 4S7 1S10 1S11 2S11 3S10 3U6 1U7 2U7 3A2 5A2 6A2	16
C20	4S10	1
C21	1U2 2U2 3U2	3
C22	1A2 2A2	2
C23	4A2	1
C24	1A3 2A3	2
C25	5M1	1
C26	1M4 2M4 3M4	3
C27	3S9 4S9 5S9 6S9	4
C28	3A3 4A3 5A3 6A3	4

^a Consultar tabelas 1 e 2 para identificação da origem das cepas.

Convencionou-se chamar de “perfis combinados” das cepas (tabela 6) àqueles padrões obtidos pela combinação dos perfis PFGE gerados individualmente com as enzimas de restrição *ApaI* e *AscI*. Desta forma as 181 cepas de *L. monocytogenes* foram distribuídas entre 60 perfis PFGE combinados e a cepa de *Salmonella* Typhi considerada como um perfil isolado. Em cada perfil combinado PFGE foram alocadas de uma a 12 cepas de *L. monocytogenes*. Os perfis com maior número de cepas foram P22C18, P30C18, P9C7, P22C13 e P11C18 com 12 (6,6%), 11 (6,1%), 11 (6,1%), 9 (5%) e 8 (4,4%) cepas, respectivamente. Estes cinco perfis reuniram 51 (28,2%) cepas.

A fim de verificar o poder discriminatório do método de tipagem empregado calculou-se o índice de discriminação *D* (HUNTER, GASTON, 1988). O poder discriminatório de um método de tipagem está relacionado à sua habilidade para distinguir cepas não relacionadas e é determinado pelo número de tipos definidos pelo método e pela frequência relativa destes tipos. Os autores citados propõem o cálculo do índice numérico de discriminação *D* para facilitar a comparação entre diferentes métodos de tipagem. Apesar de neste estudo ter sido empregado somente um método de tipagem, o índice de discriminação *D* foi utilizado para avaliar o poder discriminatório das enzimas empregadas.

Neste estudo, o valor do índice de discriminação *D* calculado para a tipagem por PFGE considerando os 60 grupos PFGE encontrados foi de 0,989. O índice de discriminação *D* calculado para os 30 perfis obtidos com a enzima de restrição *ApaI* foi igual a 0,97 e para os 28 perfis obtidos com a enzima de restrição *AscI* foi igual a 0,953, revelando que a enzima *ApaI* tem uma melhor capacidade de subtipagem. Embora a enzima *AscI* tenha apresentado um índice de discriminação inferior a *ApaI*, algumas cepas que apresentaram perfis idênticos com a enzima *ApaI*, mostraram perfis distintos com a *AscI* (Tabela 4 e 5). Estes resultados indicam que para um bom poder discriminatório da técnica é necessário a combinação de ambas as enzimas.

De acordo com HUNTER (1990), um índice de discriminação maior que 0,95 é necessário para que haja uma boa diferenciação entre as cepas quando se utiliza

apenas um método de subtipagem. Os resultados encontrados neste estudo podem ser considerados satisfatórios.

O dendrograma apresentado na figura 11 permite a visualização da relação genética entre os perfis PFGE combinados.

Ao *cluster* A pertencem 38 perfis combinados que agrupam 120 das 181 cepas estudadas. O *cluster* B é composto por 10 perfis combinados com 35 cepas e o *cluster* C é composto por 8 perfis combinados representando 22 cepas. Aos *clusters* D, E e F pertencem 1, 2 e 1 perfis combinados, respectivamente.

Aos *clusters* A e C pertencem cepas tanto do sorogrupo 1 quanto 4 havendo, entretanto, predomínio do sorogrupo 1. As cepas pertencentes ao sorogrupo 4 foram isoladas de amostras ambientais, com exceção de uma cepa do *cluster* A, pertencente ao perfil combinado P11C18 (cepa1M2) que foi isolada da mão de manipulador e (1U5) que foi isolada da caixa de salga. O *cluster* B, o 2º em número de cepas, abriga somente cepas pertencentes ao sorogrupo 4. A este *cluster* pertencem 8 das 14 cepas isoladas de produto final (cepas 4S10, 5S10, 6S10, 4S11, 5S11, 6S11, 7S11 e 8S11). Os *clusters* D, E e F também só abrigam cepas pertencentes ao sorogrupo 4 (Tabela 7 e Figura 11).

O *cluster* A pode ser dividido em outros quatro *clusters*: A.1, A.2, A.3 e A.4, sendo que aos *clusters* A.1 e A.4 pertencem somente cepas do sorogrupo 1. O mesmo pode ser observado para o *cluster* C que pode ser dividido em C.1 e C.2, com C.1 abrigando somente cepas do sorogrupo 1 (Figura 11).

Apesar de neste estudo a PFGE ter permitido a diferenciação inter-sorogrupos e intra-sorogrupos, em alguns *clusters* isto não ocorreu, como nos *clusters* A.2, A.3 e C.2. Esta limitação foi também observada por outros pesquisadores que empregando a PFGE encontraram em um mesmo perfil genético cepas pertencentes a sorogrupos diferentes (AUTIO *et al.*, 2002; GIANFRANCESCHI *et al.*, 2002; RORVIK *et al.*,

2000; GIOVANNACCI *et al.*, 1999; LONCAREVIC *et al.*, 1997 e BROSCHE *et al.*, 1994.

A fim de avaliar a distribuição das 181 cepas estudadas, nas diversas etapas do processamento, combinou-se os resultados obtidos na PFGE com aqueles da sorologia originando 8 subtipos (I a VIII) (Tabela 7).

A Tabela 8 apresenta a distribuição destes subtipos nas diferentes etapas do processamento.

Destes oito subtipos, seis foram encontrados no salmão, considerando desde a etapa de recepção até a embalagem, mostrando a grande variabilidade no perfil das cepas de *L. monocytogenes* presentes no alimento ao longo do seu processamento.

Os subtipos VI, VII e VIII foram exclusivos de cepas isolados de amostras de produto e o subtipo V foi exclusivo de amostras ambientais indicando sua adaptação a estes nichos.

As cepas do subtipo I parecem ser endógenas ao filé de salmão sendo o único tipo de *L. monocytogenes* encontrado no produto ao chegar à empresa. A partir da matéria prima pode-se supor que, devido a falhas nas Boas Práticas de Fabricação, as cepas passem a fazer parte tanto das superfícies de contato com o pescado (utensílios) quanto daquelas onde não ocorre o contato (ambiente) através da formação de biofilmes.

Uma vez que as cepas deste subtipo estão presentes no produto nas diversas etapas de processamento (Tabela 8), desde a recepção até o produto final, fica difícil definir se elas são mais adaptadas ao produto resistindo às diversas etapas de produção ou se ocorre recontaminação do mesmo através das superfícies dos equipamentos, ambiente ou de manipuladores.

Em um estudo realizado por MIETTINEN *et al.* (2001) utilizando a PFGE verificou-se que a matéria-prima contaminada por *L. monocytogenes* era responsável

pela contaminação da linha de produção (equipamentos e utensílios) levando a um produto final contaminado. RORVIK et al. (1995), RORVIK et al. (1997), AUTIO et al. (1999) e HUSS et al. (2000) também enfatizam a importância do estabelecimento de *L. monocytogenes* nas plantas processadoras como fonte de contaminação do produto.

Resultados semelhantes a este estudo foram obtidos por DAUPHIN *et al.* (2001) que encontraram cepas de *L. monocytogenes* de mesmo perfil PFGE em amostras de salmão cru, salmão embalado e manipuladores.

Observa-se na (Tabela 8) que a totalidade das cepas isoladas das mãos dos manipuladores responsáveis pelas etapas de salga seca e de fatiamento pertenciam ao subtipo I.

Por se tratar de empresa de pequeno porte é comum o deslocamento de funcionários de uma função para outra o que pode ter levado ao isolamento das cepas deste subtipo nos manipuladores (M3 e M5). De acordo com DESTRO *et al.*, (1996) e AUTIO *et al.*, (1999) a contaminação do produto pelos manipuladores não é de grande relevância, porém no caso de rotação de trabalho poderia tornar-se importante.

LONCAREVIC *et al.* (1996), verificaram que a presença de cepas adaptadas ao ambiente de processamento industrial de alimentos é muito frequente.

O subtipo II esteve restrito às etapas iniciais do processamento (U4- caixa de salga, A1 – canaleta da sala de recepção, A2 – chão da sala de recepção e A5 – chão da câmara fria) e o subtipo V à canaleta da sala de recepção (A1) (Tabelas 2 e 8). Deve-se destacar, entretanto, que o subtipo II foi isolado também das mãos de um manipulador (M2 – responsável pela retirada dos espinhos do salmão). Este manipulador pode ter se contaminado durante a limpeza da câmara fria.

O subtipo IV que foi isolado das diferentes amostras ambientais (A1 – canaleta da sala de recepção e A3 – chão da sala de lavagem) e utensílios (U2 – mesa

de filetagem da recepção) (Tabelas 2, 7 e 8) bem como de manipuladores responsáveis pela limpeza e filetagem na recepção (M1) parece estar bem adaptado ao ambiente de processamento. Cepas pertencentes a este subtipo foram isoladas do salmão desde a etapa de lavagem (Tabela 8) até a etapa de embalagem a vácuo quando o produto já estava pronto para comercialização. Estas cepas devem ter sido introduzidas no produto por falhas nas Boas Práticas de Fabricação (BPF).

O subtipo VIII foi isolado somente no salmão na etapa de fatiamento, sugerindo que o equipamento utilizado não sofre uma desinfecção adequada. Infelizmente não foi possível examinar a lâmina do fatiador para pesquisar a presença de *L. monocytogenes*. Porém, como este subtipo não foi encontrado em etapas seguintes, pode-se supor que cepas deste grupo ainda não se encontrem bem adaptadas ao produto. JOHANSSON *et al.* (1999) destacaram que as máquinas de salga e fatiamento são os principais pontos críticos das plantas, e que a aplicação de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP) deve ter o enfoque nestas áreas.

A partir da etapa de salga seca (S3) começam a aparecer no salmão cepas do subtipo III que persistem no produto até a estocagem sob refrigeração (S10) e sob congelamento (S11) (Tabelas 1 e 8). Este subtipo também foi encontrado na caixa de salga (U4) e na mão do manipulador responsável pela pulverização do jerez (M4). Esta contaminação pode ter se iniciado a partir do contato do salmão com a caixa de salga. Visto que na etapa anterior à pulverização do jerez (cura) este subtipo não foi detectado na amostra de salmão, pode-se inferir que o manipulador (M4) tenha reintroduzido este subtipo ao se contaminar em etapas anteriores (salga seca e lavagem). Conforme já foi comentado, os manipuladores não tinham atividade fixa sendo deslocados de suas atividades conforme a necessidade. A grande importância das cepas deste subtipo é o fato delas pertencerem ao sorogrupo 4, o principal causador de listeriose humana (FARBER, PETERKIN, 1991).

Cepas do subtipo VII foram isoladas do produto nas etapas de salga seca e maturação e a partir destas etapas não foram mais isoladas. Pode-se sugerir que estas cepas estariam adaptadas à pele dos filés de salmão e que, após a retirada desta este

subtipo deixou de estar presente. JEMMI & KEUTSCH, 1994; EKLUND *et al.*, 1995; RORVIK *et al.*, 1995; AUTIO *et al.*, 1999 também verificaram uma redução na presença de *L. monocytogenes* após a retirada da pele de filés de pescado sugerindo a adaptação destas cepas à pele.

Tabela 6. Distribuição das 181 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax”, conforme os 60 perfis combinados de PFGE obtidos com as enzimas *Apal* e *AscI*.

Perfil <i>Apal</i>	Perfil <i>AscI</i>	Perfil Combinado	Cepas ^a	Total de cepas
P1	C1	P1C1	3S1 1S9 2S9	3
P1	C2	P1C2	2S4 3S4 4S4 7S8	4
P1	C7	P1C7	1S4	1
P2	C1	P2C1	4S1 5S1 8S1	3
P2	C2	P2C2	6S1 7S1	2
P2	C5	P2C5	4S2	1
P2	C12	P2C12	1S1 2S1	2
P2	C18	P2C18	3S10	1
P3	C3	P3C3	1S2	1
P4	C4	P4C4	2S2 3S2	2
P4	C6	P4C6	5S10 6S10	2
P4	C7	P4C7	7S2 8S2	2
P4	C20	P4C20	4S10	1
P4	C26	P4C26	1M4 2M4 3M4	3
P5	C6	P5C6	5S2 6S2 1S3 2S3 3S3 6S7	6
P5	C11	P5C11	5S8 6S8	2
P6	C1	P6C1	8S7	1
P6	C2	P6C2	7S6	1
P6	C8	P6C8	7S7	1
P7	C9	P7C9	4S3 7S3 8S3	3
P7	C14	P7C14	4S6 5S6 6S6 8S6 4M1 6M1	6
P7	C25	P7C25	5M1	1
P8	C2	P8C2	5S4	1
P8	C10	P8C10	6S4	1
P9	C7	P9C7	1S5 2S5 3S5 4S5 5S5 1U4 2U4 3U4 4U4 5U4 6U4	11
P10	C3	P10C3	3S6	1
P11	C1	P11C1	1M5	1
P11	C13	P11C13	2S8 3S8 4S8	3
P11	C18	P11C18	1S11 2S11 1M2 2M2 3M2 4M2 5M2 6M2	8
P11	C19	P11C19	1S6 2S6 1S7 2S7 3S7 4S7	6
P12	C7	P12C7	5S7	1
P13	C17	P13C17	1S8	1
P14	C16	P14C16	8S8	1

continua

continuação Tab.6

Perfil <i>Apal</i>	Perfil <i>AscI</i>	Perfil Combinado	Cepas ^a	Total de cepas
P15	C27	P15C27	3S9 4S9 5S9 6S9	4
P16	C18	P16C18	1S10	1
P17	C13	P17C13	1U6 2U6 4U6 5U6	4
P17	C18	P17C18	2S10	1
P18	C15	P18C15	3S11	1
P19	C7	P19C7	4S11 5S11 6S11 7S11 8S11	5
P20	C12	P20C12	3A1 6A1	2
P20	C21	P20C21	1U2 2U2 3U2	3
P20	C24	P20C24	1A3 2A3	2
P21	C12	P21C12	1U3 2U3	2
P21	C18	P21C18	4A1 5A1 7A1 8A1	4
P21	C19	P21C19	3U6 3A2 5A2 6A2	4
P21	C23	P21C23	4A2	1
P21	C28	P21C28	3A3 5A3 6A3	3
P22	C13	P22C13	3U3 4U3 5U3 1A6 2A6 3A6 4A6 5A6 6A6	9
P22	C18	P22C18	1A4 2A4 3A4 4A4 5A4 6A4 1A5 2A5 3A5 4A5 5A5 6A5	12
P22	C22	P22C22	1A2 2A2	2
P23	C1	P23C1	1U5 2U5 3U5 4U5 5U5 6U5	6
P24	C19	P24C19	1U7 2U7	2
P25	C13	P25C13	1A7 2A7 3A7	3
P26	C13	P26C13	4A7 5A7 6A7	3
P27	C1	P27C1	2M5 7M5	2
P28	C1	P28C1	3M5 4M5 5M5 6M5	4
P29	C8	P29C8	5S3 6S3	2
P30	C13	P30C13	1M3 2M3 3M3	3
P30	C18	P30C18	1U1 2U1 3U1 4U1 5U1 6U1 1A1 2A1 1M1 2M1 3M1	11
P30	C28	P30C28	4A3	1

^a Consultar tabelas 1 e 2 para identificação da origem das cepas.

Tabela 7. Distribuição das 181 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax”, conforme os 8 subtipos formados pela combinação dos resultados da sorologia e do PFGE.

Subtipo	cluster PFGE	Sorogrupo	Cepas ^a	Total de cepas
I	A	1	1S1 2S1 3S1 4S1 5S1 6S1 7S1 8S1 4S2 5S3 6S3 1S4 2S4 3S4 4S4 5S4 6S4 1S6 2S6 7S6 1S7 2S7 3S7 4S7 7S7 8S7 2S8 3S8 4S8 7S8 1S9 2S9 1S10 2S10 3S10 1S11 2S11 1U1 2U1 3U1 4U1 5U1 6U1 1U3 2U3 3U3 4U3 5U3 1U5 2U5 3U5 4U5 5U5 6U5 1U6 2U6 3U6 4U6 5U6 6U6 1U7 2U7 3U7 4U7 5U7 1A1 2A1 4A1 8A1 1A2 2A2 3A2 5A2 6A2 3A3 4A3 5A3 6A3 1A4 2A4 3A4 4A4 5A4 6A4 4A5 5A5 6A5 1A6 2A6 3A6 4A6 5A6 6A6 1A7 2A7 3A7 4A7 5A7 6A7 1M1 2M1 3M1 2M2 3M2 4M2 5M2 6M2 1M3 2M3 3M3 1M5 2M5 3M5 4M5 5M5 6M5 7M5	113
II	A	4	3U4 5A1 7A1 4A2 1A5 2A5 3A5 1M2	8
III	B	4	2S2 3S2 5S2 6S2 7S2 8S2 1S3 2S3 3S3 1S5 2S5 3S5 4S5 5S5 5S7 6S7 5S8 6S8 4S10 5S10 6S10 4S11 5S11 6S11 7S11 8S11 1U4 2U4 4U4 5U4 6U4 1M4 2M4 3M4	34
IV	C	1	4S3 7S3 8S3 4S6 5S6 6S6 8S6 8S8 3S9 4S9 5S9 6S9 1U2 2U2 3U2 3A1 1A3 2A3 4M1 5M1 6M1	21
V	C	4	6A1	1
VI	D	4	3S11	1
VII	E	4	1S2 3S6	2
VIII	F	4	1S8	1

^a Consultar tabelas 1 e 2 para identificação da origem das cepas.

Tabela 8. Distribuição dos 8 subtipos de *L. monocytogenes* (I a VIII), obtidos pela combinação dos resultados da sorologia e do PFGE, nas diferentes etapas do processamento de salmão “gravlax”.

Etapa do processamento	Subtipos ^a das cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas de amostras de			
	Produto	Utensílio	Ambiente	Manipulador
Recepção	I	I IV	I II IV V	I II IV
Salga seca	I III VII	I II III		I
Retirada do excesso de sais			I IV	
Lavagem	I III IV			
Cura	I			
Pulverização do jerez	III			III
Maturação	I IV VII		I II	
Retirada da pele	I III	I		
Fatiamento	I III IV VIII		I	I
Porcionamento		I		
Embalagem à vácuo	I IV	I		
Estocagem (Refrigeração)	I III			
Estocagem (Congelamento)	I III VI			

^a Consultar tabela 7 para identificação das cepas pertencentes a cada subtipo.

Figura 11. Representação da relação genética entre os 60 perfis combinados de PFGE obtidos para as cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento de salmão “gravlax” e uma cepa de *Salmonella* Typhi escolhida como grupo externo.

Conforme pode ser verificado neste estudo, a disseminação de *L. monocytogenes* na linha de processamento avaliada está generalizada, ocorrendo tanto a presença de cepas “residentes”, ou seja aquelas que colonizaram o ambiente e fazem parte dele, como a introdução de cepas através da matéria prima. Desta forma não há uma única forma para a diminuição ou eliminação da contaminação do produto por *L. monocytogenes*. A solução seria a implementação inicialmente das BPF e, a seguir, do sistema de HACCP. Muitas cepas isoladas de uma mesma amostra apresentaram diferentes perfis PFGE (Tabela 8), o que pode indicar mais de uma fonte de contaminação para um mesmo ponto de coleta.

O controle total da presença de *L. monocytogenes* no produto final não é fácil de ser conseguido (JEMMI, 1993; BEM EMBAREK, 1994; HUSS *et al.*, 1995; AUTIO *et al.*, 1999). No entanto, como a contaminação parece ir ocorrendo durante o processamento do salmão, é possível que se obtenha uma redução nesta contaminação para níveis baixos ao se adotar as BPF (HUSS *et al.*, 1995)

Este trabalho deve ser iniciado com a busca de fornecedores da matéria-prima com uma menor carga de patógeno, uma vez que se verificou que a matéria-prima já chega à indústria contaminada com subtipo resistente às condições de processamento. Sabe-se que o salmão é importado do Chile, e que este produto apresenta uma alta contaminação natural devido a características particulares da costa marítima chilena (GRAM, comunicação pessoal).

Também deve-se ter mais cuidado com os processos de limpeza e sanificação, uma vez que cepas adaptadas aos ambientes e utensílios foram encontradas no produto final, indicando a presença de biofilmes. Outro ponto importante é o treinamento dos manipuladores que podem ser veículo da contaminação cruzada do produto.

Somente após a solução destes problemas é que se pode pensar na implementação de um plano HACCP, que irá garantir o fornecimento ao consumidor de produto de baixo risco. Por se tratar de um alimento que não sofre nenhum tipo de tratamento antes de ser consumido, é necessário um controle rigoroso sobre a presença de *L. monocytogenes*.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e a discussão apresentada conclui-se que:

- Houve predomínio de cepas de *L. monocytogenes* pertencentes ao sorogrupo 1, entretanto, cepas do sorogrupo 4 também foram encontradas.
- A presença de cepas do sorogrupo 4 no produto final é indicativa do risco do consumo de salmão “gravlax” à saúde da população susceptível.
- A matéria-prima já chega à indústria contaminada por *L. monocytogenes* de subtipo capaz de sobreviver às diferentes etapas de processamento.
- A partir da matéria-prima ocorreu a introdução de um subtipo de *L. monocytogenes* que se disseminou por toda a linha de produção.
- O ambiente, os equipamentos e manipuladores podem levar à contaminação por *L. monocytogenes* do salmão “gravlax” através de contaminação cruzada.
- A única forma de controlar a presença de *L. monocytogenes* na indústria em questão é a aplicação das Boas Práticas de Fabricação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRIGHETO, C. Disseminação de *L. monocytogenes* em uma linha de produção de "nuggets" congelados de frango. São Paulo, 2000 (Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo).
- ARBEIT, R. D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In : **Manual of clinical microbiology**, Washington, ASM, p.190-208, 1995.
- AUTIO, T., HIELM, S., MIETTINEN, M., SJOBERG, A.-M, AARNISALO, K., BJORKROTH, J., SANDHOLM, T.M., KORKEALA, H. Sources of *L. monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, p.150-155, 1999.
- AUTIO, T., LUNDÉN, J., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., BJORKROTH, J., SJOBERG, A.-M., KORKEALA, H. Similar *L. monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 77, p. 83-90, 2002.
- BAKER, M., BRETT, M., SHORT, P., CALDER, L. THOINTON, T. Listeriosis and mussels. **Communicable Dis.**, v. 93, 13-14, 1993.
- BEN EMBAREK, P.K. Presence, detection and growth of *L. monocytogenes* in seafoods: a review. **Int. J. Food Microbiol.**, v.23, p. 17-34, 1994.
- BIRREN, B., LAI, E. **Pulsed-field gel electrophoresis: A practical guide**. San Diego: Academic Press, 253p., 1993.
- BLACKMAN, I. C., FRANK, J.F. Growth of *L. monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. **J. Food. Prot.**, v. 59, n. 8, p. 827-831, 1996.

- BRASIL. Resolução RDC n°12, de 2 de jan. 2001. **Ministério da Saúde - ANVISA**, 2001.
- BRETT, M.S.Y., SHORT, P., McLAUCHLIN, J. A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. **Int. J. Food Microbiol.**, v.43, p.223-229, 1998.
- BROSCH, R., BUCHRIESER, C., ROCOURT, J. Subtyping of *L. monocytogenes* serovar 4b by use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases and pulsed-field gel electrophoresis. **Res. Microbiol.**, v.142, p. 667-675, 1991.
- BROSCH, R., CHEN, J., LUCHANSKY, J.B. Pulsed-field fingerprinting of *Listeriae*: Identification of genomic divisions for *L. monocytogenes* and their correlation with serovar. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.60, n. 7, p. 2584-2592, 1994.
- BUCHANAN, R. L., DAMERT, W.G., WHITING, R.C., SCHOTHORST, M.V. Use of epidemiologic and food survey data to estimate a purposefully conservative dose-response relationship for *L. monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. **J. Food. Prot.**, v. 60, n. 8, p. 918-922, 1997.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION(CDC). Preliminary Foodnet data on the incidence of foodborne illnesses. **MMWR**, v.50, n.13, p.241-246, 2001.
- DAUPHIN, G. RAGIMBEAU, C., MALLE, P. Use of PFGE typing for tracing contamination with *L. monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 64, p.51-61, 2001.
- DESTRO, M.T. Incidence and significance of *Listeria* in fish and fish products from Latin America. **Int. J. Food Microbiol.**, v.62, p.191-196, 2000.

- DESTRO, M.T., LEITÃO, M.F.F., FARBER, J.M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *L. monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.62, n.2, p. 705-711, 1996.
- DICE, L.R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecol.**, v.26, p. 297-302, 1945.
- ECONOMIC RESEARCH SERVICE (ERS). <http://ers.usda.gov/briefing/foodborne/disease/listeria/index/htm>. Acesso em 15 de janeiro de 2003.
- EKLUND, M.W., POYSKY, F.T., PARANJPYE, R.N., LASHBROOK, L.C., PETERSON, M.E., PELROY, G.A. Incidence and sources of *L. monocytogenes* in cold smoking fishery products and processing plants. **J. Food Prot.**, v.58, p.502-508, 1995.
- ERICSSON, H., EKLOW, A., DANIELSSON-THAM, M.-L., LONCAREVIC, S., MENTZING, L.-O., PERSSON, I., UNNERSTAD, H., THAM, W. An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, p.2904-2907, 1997.
- ERICSSON, H., STALHANDSKE, P. PCR detection of *L. monocytogenes* in "gravad" rainbow trout. **Int. J. Food Microbiol.**, v.35, p. 281-285, 1997.
- FACINELLI, B., VARALDO, P.E., TONI, M., CASOLARI, C., FABIO, U. Ignorance about *Listeria*. **Br. Med. J.** v.299, p.738, 1989.
- FAO Fish utilization and marketing service; FAO Food quality and standards service. Report of the FAO Expert Consultation on The Trade Impact of *Listeria* in Fish Products. Amherst, MA, USA, 17-20, 1999. **FAO Fisheries Report** n.604, FAO. 34p. 1999.

- FARBER, J.M. FAO expert consultation on the trade impact of *Listeria* in fish products. **Int. J. Food Microbiol.**, v.62, p. 171, 2000.
- FARBER, J.M., DALEY, E., MACKIE, M.T., LIMERICK, B. A small outbreak of listeriosis potentially linked to the consumption of imitation crab meat. **Lett. Appl. Microbiol.** (in press), 2000.
- FARBER, J.M., PETERKIN. P.I. *L. monocytogenes*, a foodborne pathogen. **Microbiol. Rev.**, v. 55, p. 476-511, 1991.
- FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. Recall information center. http://www.fsis.usda.gov/AO/recalls/rec_pr.htm. Acesso em 16 de outubro de 2002.
- FREDERIKSEN, W. *Listeria* epidemiology in Demark 1981-1990. In: Conferência Internacional sobre *Listeria* e Segurança Alimentar. Laval, 1991, **Proceedings**. Laval: ASEPT, p. 48-49, 1991.
- GIANFRANCESCHI, M., POURSHABAN, M., GATTUSO, A., NEERGAARD, W.C., AURELI, P. Characterization of *L. monocytogenes* strains isolated from food and humans in Italy by pulsed field gel electrophoresis. **Food Microbiol.**, v. 19, p. 47-55, 2002.
- GIOVANNACCI, I., RAGIMBEAU, C., QUEGUINER, S., SALVAT, G., VENDEUVRE, J-L., CARLIER, V., ERMEL, G., *L. monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE, and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. **Int. J. Food Microbiol.**, v.53, p. 127-140, 1999.
- GRAVANI, R. *Listeria* in food-processing facilities- status of *L. monocytogenes* in foods. In: Ryser, E.T., Marth, E.H. **Listeria, listeriosis and food safety**. Marcel Dekker, New York, 1999.

GRAVES, L.M., SWAMINATHAN, B. Pulsenet standardized protocol for subtyping *L. monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. **Int. J. Food Microbiol.**, v.65, p.55-62, 2001.

GRAVESEN, A., JACOBSEN, T., MOLLER, P.L., HANSEN, F., LARSEN, A. G., KNOCHEL, S. Genotyping of *L. monocytogenes*: comparison of RAPD, ITS and PFGE. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 57, p. 43-51, 2000.

HARTEMINK, R., GEORGSSON, F. Incidence of *Listeria* species in seafood and seafood salads. **Int. J. Food Microbiol.**, v.12, p.189-196, 1991

HOFER, E., RIBEIRO, R. Ocorrência de espécies de *Listeria* em camarão industrializado. **Rev. Microbiol.**, v. 21, p. 207-208, 1990.

HOFFMAN, A. D., GALL, K.L., NORTON, D.M., WIEDMANN, M. *L. monocytogenes* contamination patterns for the smoked fish processing environment and for raw fish. **J. Food. Prot.**, v. 66, p. 2-60, 2003.

HUNTER, P.R., GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **J. Clin. Microbiol.**, v.26, n.11, p. 2465-2466, 1988.

HUSS, H., BEN EMBAREK, P., JEPPESEN, V. Control of biological hazards in cold salmon production. **Food Control**, v. 6, p. 335-340, 1995.

HUSS, H.H., JORGENSEN, L.V., VOGEL, B.F. Control options for *L. monocytogenes* in seafoods. **Int. J. Food Microbiol.**, v.62, p.267-274, 2000.

INFRA-ESTRUTURA BRASIL. Balança de pescado tem superávit de 22,6 milhões de dólares. Disponível em: http://www.infraestruturabrasil.gov.br/noticia/not_detalhe.asp?not=-1257513179&proj=421. Acesso em: 22 de abril de 2002.

- JACQUET, C., CATIMEL, B., BROSCHE, R., BUCHRIESER, C., DEHAUMONT, P., GOULET, V., LEPOUTRE, V., VEIT, P., ROCOURT, J. Investigations related to the epidemic strain involved in the french listeriosis outbreak in 1992. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 2242-2246, 1995.
- JEMMI, T. *L. monocytogenes* in smoked fish: an overview. **Arch. Lebensmittellehyg**, v.44, p. 10-13, 1993.
- JEMMI, T., KEUSCH, A. Behavior of *L. monocytogenes* in freshwater fish farms and fish-smoking plants. **Food Microbiol.**, v.11, n.4, p.309-316, 1994.
- JOHANSSON, T. RANTALA, L., PALMU, L., BUZALSKI-HONKANEN, T. Occurrence and typing of *L. monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish products and in a production plant. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 47, p. 111-119, 1999.
- KARUNASAGAR, I., KARUNASAGAR, I. *Listeria* in tropical fish and fishery products. **J. Food. Prot.**, v. 62, p. 177-181, 2000.
- KEROUANTON, A., BRISABOIS, A., DENOYER, E., DILASSER, F., GROUT, J., SALVAT, G., PICARD, B. Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *L. monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.**, v.43, p. 61-71, 1998.
- LANDGRAF, I.M., KOBATA, A.M.M., JAKABI, M., KIRSCHBAUM, C.R.A., MARCHI, C.R. Surto de meningite neonatal por *L. monocytogenes*. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.58, n.1, p.63-67, 1999.
- LAWRENCE, L.M., GILMOUR, A. Characterization of *L. monocytogenes* isolated from poultry products and from the poultry processing environment by random amplification of polymorphic Dna and multilocus enzyme electrophoresis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 2139-2144, 1995.

- LENNON, D., LEWIS, B., MANTELL, C., BECFROT, D., DOVE, B., FARMER, K., TONKIN, S., YEASTES, N., STAMP, R., MICKLESON, K. Epidemic perinatal listeriosis. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 3, p. 30-34, 1984.
- LONCAREVIC, S., DANIELSSON-THAM, M.L., MARTENSSON, L., RINGNER, A., RUNCHAGEN, A., THAM, W. A case of foodborne listeriosis in Sweden. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 24, p. 64-68, 1997.
- LONCAREVIC, S., DANIELSSON-THAM, M.L., SMIDT, G.P., SAHLSTROM, L., THAM, W. Potential sources of human listeriosis in Sweden. **Food Microbiol.**, v. 15, p. 65-69, 1998.
- LONCAREVIC, S., THAM, W., DANIELSSON-THAM, M.L. Prevalence of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp in smoked and “gravad” fish. **Acta Vet. Scand.**, v.37, p.13-18, 1996.
- MAFU, A. A., ROY, D., GOULET, J., SAVOIE, L., MAGNY, P. Efficiency of sanitizing agents for destroying *L. monocytogenes* on contaminated surfaces. **J. Dairy Sci.**, v.73, p. 3428-3432, 1990.
- McLAUHLIN, J. The relationship between *Listeria* and listeriose. **Food Control**, v.7, n. 4/5, p. 187-193, 1996.
- MERGUIZZO, M.A. Salmão: O guerreiro que veio do frio. **Revista Go Where?**, Ano VI, n.28 - São Paulo, 2001.
- MIETTINEM, M.K., BJORKROTH, K.J., KORKEALA, H.J. Characterization of *L. monocytogenes* from na ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 46, p. 187-192, 1999.

- MIETTINEN, H., AARNISALO, K., SALO, S., SJOBERG, A.M. Evaluation of surface contamination and the presence of *L. monocytogenes* in fish processing factories. **J. Food. Prot.**, v.64, n.5, p.635-639, 2001.
- MITCHELL, D.L. A case *cluster* of listeriosis in Tasmania. **Comm. Dis. Intel.** v.15, p.427, 1991.
- NAKAMA, A., TERAOKA, M., KOKUBO, Y., ITOH, T., MARUYAMA, T., KANEUCHI, C., McLAUCHLIN, J. A Comparison of *L. monocytogenes* serovar 4b isolates of clinical and food origin in Japan by pulsed-field gel electrophoresis. **Int. J. Food Microbiol.**, V.42, p. 2001-206, 1998.
- NILSSON, L., HUSS, H.H., GRAM, L. Inhibition of *L. monocytogenes* in cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. **Int. J. Food Microbiol.**, v.38, p.217-227, 1997.
- NORRUNG, B. Microbiological criteria for *L. monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches. **J. Food. Prot.**, v. 62, p. 217-221, 2000.
- OJENIYI, B., WENEGER, H.C., JENSEN, N.E., BISGAARD, M. *L. monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiological investigations in seven danish abattoirs. **J. Appl. Bacteriol.**, v.80, p. 395-40, 1996.
- PEREIRA, M.L., BUCHRIESER, C., BROSCHE, R., CATIMEL, B., ROCOURT, J., HOFER, E. Characterization of Brazilian *L. monocytogenes* strains using Dna macrorestriction patterns. **Rev. Microbiol.**, v. 25, p. 144-148, 1994.
- PHLS FOOD HYGIENE LABORATORY. Human listeriosis cases: England and Wales, 1983-2000. <http://www.phls.co.uk/facts/gastro/listeria/listann.htm>. Acesso em: 24 de abril de 2002.

- POURSHABAN, M., GIANFRANCESCHI, M., GATTUSO, A., MENCONI, F., AURELI, P. Identification of *L. monocytogenes* contamination sources in two fresh sauce production plants by pulsed-field gel electrophoresis. **Food Microbiol.**, v.17, p.393-400, 2000.
- PROCTOR, M.E., BROSCHE, R., MELLEN, J.W., GARRETT, L.A., KASPAR, C.W., LUCHANSKY, J.B. Use of pulsed-field gel electrophoresis to link sporadic cases of invasive listeriosis with recalled chocolate milk. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.61, n.8, p.3177-3179, 1995.
- RIEDO, F.X., PINNER, R.W., TOSCA, M.D., CARTTER, M.L., GRAVES, L.M., REEVES, M.W., WEAVER, R.E., PLIKAYTIS, B.D., BROOME, C.V. A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. **J. Infect. Dis.** v.170, p.696-696, 1994.
- ROBERTS, T., PINNER, R. Economic impact of disease caused by *L. monocytogenes*. In: MILLER, A.J., SMITH, J.L., SOMKUTI, G.A. Foodborne Listeriosis. **Elsevier Science Publishing Company Inc.**, cap.22, p.137-148, 1990.
- ROCOURT, J. Risks factors for listeriosis. **Food Control**, Guilford, v.7, n.4/5, p.195-202, 1996.
- ROCOURT, J., JACQUET, Ch., REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and seafood. **Int. J. Food Microbiol.**, v.62, p.197-209. 2000.
- RODRIGUES, D.A. *Listeria* sp e *L. monocytogenes* em indústria processadora de nuggets de frango: estudo de ocorrência e avaliação de metodologias de análise. São Paulo, 1999. (Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo).

- RORVIK, L.M., CAUGANT, D.A., YNDESTAD, M. Contamination pattern of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. **Int. J. Food Microbiol.**, v.25, p.19-27, 1995.
- RORVIK, L.M., SKJERVE, E., KNUDSEN, B.R., YNDESTAD, M. Risk factors for contamination of smoked salmon with *L. monocytogenes* during processing. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.37, p.215-219, 1997.
- RORVIK, L.M., AASE, B., ALVESTAD, T., CAUGANT, D.A. Molecular epidemiological survey of *L. monocytogenes* in seafoods and seafood processing plants. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 4779-4784, 2000.
- RYSER, E.T., MARTH, E.H. ***Listeria*, listeriosis and food safety**. 1st ed. New York: Marcel Dekker, 650p., 1991.
- RYSER, E.T., MARTH, E.H. ***Listeria*, listeriosis and food safety**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 738p., 1999.
- SCHELCH, W.F., LAVIGNE, P.M., BORTOLUSSI, R.A., ALLEN, A.C., HALDANE, E.V., WORT, A.J., HIGHTOWER, A.W., JOHNSON, S.E., KING, S.H., NICHOLLS, E.S., BROOME, C.V. Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. **New Engl. J. Med.**, v.308, p. 203-206, 1983.
- SENCSEK, D., STEPHAN, R., UNTERMANN, F. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 62, p. 155-159, 2000.
- SHANK, F. R., ELLIOT, E.L., WACHSMUTH, I.K., LOSIKOFF, M.E. US position on *L. monocytogenes* in foods. **Food control**, v.7, n. 4/5, p. 229-234, 1996.

- SILVESTRE, F.A. *L. monocytogenes* em salmão “gravlax”: ocorrência e comportamento durante a estocagem refrigerada do produto. São Paulo, 2000. (Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo).
- SKOVGAARD, N. Listeriosis: A foodborne zoonotic disease. **Scand. Dairy**, v. 2, p. 5-7, 1988.
- SNEATH, P.H.A., SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**. San Francisco: Freeman, 573p., 1973
- STATENS, J. Consumpt of food in Sweden. **Rapport 1996-1997**, 1996.
- TENOVER, F.C., ARBEIT, R.D., GOERING, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for healthcare epidemiologists. **Infect. Control and Hospital Epidemiology**, p. 426-439, 1997.
- THAM, W., ERICSSON, H., LONCAREVIC, S., UNNERSTAD, H., DANIELSSON-THAM, M. L. Lessons from na outbreak of listeriosis related to vacuum-packed gravad and cold-smoked fish. **J. Food. Prot.**, v.62, p. 173-175, 2000.
- UNNERSTAD, H., BANNERMAN, E., BILLE, J., THAM, D.M.L., WAAK, E., THAM, W. Prolonged contamination of a dairy with *L. monocytogenes*. **Neth. Milk Dairy**, v. 50, p. 493-499, 1996.
- VANNE, L., KARWOSKI, M, KARPPINEN, S., SJOBERG, A-M. HACCP based food quality control and rapid detection methods for microorganisms. **Food Control**, v.7, n.6, p. 263-276, 1996.
- VARNAM, A.H., EVANS, M.G. **Foodborne Pathogens: an illustrated test**. 1st edition: London, Wolfe Publishing , 557p, 1991.

VELA, A.I., GARAYZABAL, F.F.J., VAZQUEZ, J.A., LATRE, M.V., BLANCO, M.M., MORENO, M.A., DE LA FUENTE, L., MARCO, J., FRANCO, C., CEPEDA, A., MOURE, R.A.A., SUAREZ, G., DOMINGUEZ, L. Molecular typing by pulsed field gel electrophoresis of spanish animal and human *L. monocytogenes* isolates. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 5840-5843, 2001.