Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Listeria monocytogenes em camarão
(*Penaeus brasiliensis*): marcadores
sorológicos e genéticos no monitoramento
de sua disseminação em uma unidade
processadora de pescado.

Maria Teresa Destro

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Mauro F. de Freitas Leitão

São Paulo
- 1995 -

Maria Teresa Destro

Listeria monocytogenes em camarão (*Penaeus brasiliensis*):
marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua
disseminação em uma unidade processadora de pescado.

Comissão Julgadora
Tese para a obtenção do grau de
Doutor

Prof. Dr. MAURO F. DE FREITAS LEITÃO

Presidente (Orientador)

Prof. Tit. LUIZ RACHID TRABULSI

1º Examinador

Prof. Dra. TÂNIA A. GOMES

2º Examinador

Prof. Dra. MARINA BAQUERIZO MARTINEZ

3º Examinador

Prof. Assoc. BERNADETTE D.G.M. FRANCO

4º Examinador

São Paulo, 25 de julho de 1995.

A meus pais, Mario e Ida,
que me deram pincéis e tintas
para que eu pudesse pintar
meu próprio quadro.

Ao Álvaro,
por termos sobrevivido
a mais esta etapa.

Agradecimentos

- Ao Dr. Mauro Farber de Freitas Leitão, pelo apoio e orientação dados ao longo destes anos;
- Ao Dr. Jeffrey M. Farber, pela acolhida em seu laboratório, orientação e amizade;
- À Mariza Landgraf, meu "Grilo-Falante", por TODOS os toques;
- À Bernadette D. G. M. Franco, pela amizade e estímulo;
- À Fernanda Cristina Piva, pelo auxílio na primeira fase desta pesquisa;
- Ao Sr. Reinaldo Rodrigues da Silva, pelo auxílio na coleta das amostras;
- Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, tanto aqueles que passaram (Magda, Adriana, ...) como aqueles que ainda estão por aqui (Regina, Lúcia, Paes, ...), por me aturarem;
- A todos os amigos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pela força;
- À Marilene de V. Camargo Penteado e Jorge Mancini Filho, Chefes do FBA durante a realização desta pesquisa, pelo apoio;
- À Pearl I. Peterkin, pela acolhida em sua casa, pela amizade e carinho;
- Ao Dr. K. Rayman, chefe da Microbiology Research Division do Health Protection Branch, Canadá, pela concessão do estágio;
- À Elaine Daley, pelo auxílio técnico durante a tipagem molecular das cepas;
- Aos amigos da Microbiology Research Division e Evaluation Division, pela ajuda e por terem tornado minha estada no Canadá tão agradável;
- Ao Richard A. Musca, pelo desenvolvimento do DnaTool Kit;

- Ao Dr. J. McLauchlin, do Public Health Laboratory Service de Londres, pela sorotipagem e fagotipagem das cepas de *L. monocytogenes*;
- Ao Dr. S. Fritschell do DuPont Central Research and Development, pela ribotipagem das cepas de *L. monocytogenes*;
- À bibliotecária Moema Rodrigues Santos, pela revisão das referências bibliográficas;
- À FAPESP, pelo financiamento da primeira fase desta pesquisa;
- Ao CNPq, pela bolsa de estudos;
- E a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, auxiliaram na realização desta tese;

meu muito obrigada.

"Eu sustento que a única finalidade da ciência reside em aliviar a miséria da existência humana. E, se os cientistas intimidados pela prepotência dos poderosos acham que basta amontoar sabedoria, pelo amor da sabedoria, a ciência pode ser transformada num aleijão, e as vossas novas máquinas serão novas aflições, nada mais."

A vida de Galileu, B. Brecht

Índice

1. Introdução	1
2. Objetivos	39
3. Material e métodos	40
3.1. Material	40
3.1.1. Estudo da ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i>	40
3.1.1.1. Meios de cultura	40
3.1.1.2. Soluções	41
3.1.1.3. Outros	42
3.1.2. Determinação antigênica e do perfil de DNA de <i>Listeria monocytogenes</i>	42
3.1.2.1. Meios de cultura	42
3.1.2.2. Soluções	42
3.1.2.3. Equipamentos	43
3.1.2.4. Outros	44
3.2. Métodos	45
3.2.1. Coleta das amostras	46
3.2.1.1. Camarões	46
3.2.1.2. Manipuladores	48
3.2.1.3. Água	48
3.2.1.4. Ambiente e utensílios	50
3.2.1.5. Gelo	52
3.2.2. Isolamento de <i>Listeria</i> spp.	54
3.2.2.1. Enriquecimento primário	54
3.2.2.2. Enriquecimento secundário e isolamento	54
3.2.2.3. Seleção e purificação das colônias suspeitas	55
3.2.2.4. Identificação das cepas	55
3.2.3. Sorotipagem e fagotipagem das cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	58

3.2.4. Caracterização molecular das cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	58
3.2.4.1. Ribotipagem	58
3.2.4.2. Análise do polimorfismo do DNA por amplificação aleatória (RAPD).....	58
3.2.4.3. Análise do polimorfismo do DNA por eletroforese em gel de campo pulsante (PFGE)	60
4. Resultados e discussão	63
4.1. Estudo da ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i>	63
4.2. Sorotipagem e fagotipagem das cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	79
4.3. Caracterização molecular das cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	85
4.3.1. Ribotipagem pelo sistema RiboPrint™	85
4.3.2. RAPD	87
4.3.3. PFGE	96
5. Conclusões	120
6. Referências bibliográficas	123
7. Resumo	139
8. Summary	141

Índice de tabelas

Tabela 1 - Características diferenciais das espécies de <i>Listeria</i>	3
Tabela 2 - Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> em diferentes tipos de amostras coletadas em uma indústria processadora de pescados, localizada em Santos, SP	64
Tabela 3 - Frequência de isolamento de <i>L. monocytogenes</i> a partir de mãos de trabalhadores de uma linha de processamento industrial de camarão rosa (<i>Penaeus brasiliensis</i>)	65
Tabela 4 - Frequência de isolamento de <i>L. monocytogenes</i> a partir de utensílios utilizados em uma linha de processamento industrial de camarão rosa (<i>Penaeus brasiliensis</i>)	68
Tabela 5 - Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> em amostras de água, colhidas em diferentes pontos de uma linha de processamento industrial de camarão rosa (<i>Penaeus brasiliensis</i>)	70
Tabela 6 - Prevalência das espécies de <i>Listeria</i> isoladas de 178 amostras de camarão rosa (<i>Penaeus brasiliensis</i>), coletadas em uma indústria processadora de pescados, localizada em Santos, SP	76
Tabela 7 - Identificação e origem das cepas de <i>L. monocytogenes</i> utilizadas para sorotipagem e tipagem molecular	81
Tabela 8 - Sorovares e fagovares de 25 cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas a partir de amostras de diversas fontes, colhidas em uma usina processadora de pescados, localizada em Santos, SP	82
Tabela 9 - Total de cepas de <i>L. monocytogenes</i> fagotipáveis e não fagotipáveis, dentre as 25 isoladas a partir de amostras de diversas fontes, colhidas em uma usina processadora de pescados, localizada em Santos, SP	83
Tabela 10 - RiboGroup™ gerados pelo sistema RiboPrint™ da DuPont, de 25 cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas a partir de amostras de diversas fontes, colhidas em uma usina processadora de pescados, localizada em Santos, SP	85
Tabela 11 - Padrão de bandas do DNA de 115 cepas de <i>L. monocytogenes</i> , para os perfis 1 a 11 obtidos pelo método RAPD com o iniciador UBC155	89

Tabela 12 - Perfis do DNA de 115 cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas de diversas fontes de uma usina processadora de pescados, localizada em Santos, SP, e identificados pelos métodos RAPD e PFGE	90
Tabela 13 - Padrão de bandas do DNA de 115 cepas de <i>L. monocytogenes</i> , para os perfis 1 a 16 obtidos pelo método RAPD com o iniciador UBC127	91
Tabela 14 - Padrão de bandas do DNA de 115 cepas de <i>L. monocytogenes</i> , para os perfis 1 a 13 obtidos pelo método PFGE, após digestão com a enzima de restrição <u>Sma</u> I	98
Tabela 15 - Padrão de bandas do DNA de 115 cepas de <i>L. monocytogenes</i> , para os perfis 1 a 15 obtidos pelo método PFGE, após digestão com a enzima de restrição <u>Apa</u> I	101
Tabela 16 - Perfis do DNA de 25 cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas de diversas fontes de uma usina processadora de pescados, em Santos, SP, e identificadas com RAPD e PFGE	108
Tabela 17 - Perfis compostos do DNA de cepas de <i>L. monocytogenes</i> presentes nas diferentes áreas de uma usina processadora de pescados, localizada em Santos, SP	112
Tabela 18 - Resumo dos resultados obtidos, relacionando as cepas isoladas nos diferentes pontos de amostragem e seu perfil composto	114

Índice de figuras

Figura 1 - Representação esquemática da reação de polimerização em cadeia	32
Figura 2 - Representação esquemática dos fragmentos gerados pela amplificação de seqüências aleatoriamente distribuídas no cromossomo, empregando-se o método RAPD	34
Figura 3 - Representação esquemática do processamento industrial de camarão rosa indicando os pontos de coleta das amostras de camarão (P)	47
Figura 4 - Representação esquemática do processamento industrial de camarão rosa indicando os pontos de coleta das amostras de manipuladores (M) e de água (A)	49
Figura 5 - Representação esquemática do processamento industrial de camarão rosa indicando os pontos de coleta das amostras ambientais (AB) e de utensílios (U)	53
Figura 6 - Representação esquemática da metodologia, para análise de <i>Listeria sp.</i> , preconizada pelo Health Protection Branch do Canadá (WARBURTON et alii., 1991) para amostras de alimentos e água	56
Figura 7 - Representação esquemática da metodologia, para análise de <i>Listeria sp.</i> , para amostras ambientais (modificada de WARBURTON et alii., 1991)	57
Figura 8 - Frequência de isolamento de <i>L. monocytogenes</i> em amostras ambientais, coletadas em diferentes pontos de uma usina processadora de pescados localizada em Santos, SP	72
Figura 9 - Frequência de isolamento de <i>L. monocytogenes</i> em amostras de camarão rosa (<i>Penaeus brasiliensis</i>), coletadas em diferentes pontos de uma linha de processamento industrial	77
Figura 10 - Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> nas diferentes amostras examinadas, durante o período de maio a setembro de 1993, em uma usina processadora de pescados, localizada em Santos, SP	78

Figura 11 - Representação gráfica dos padrões de bandas do DNA, para os perfis 1 a 11, obtidos pelo método RAPD com o iniciador UBC 155	88
Figura 12 - Representação gráfica dos padrões de bandas do DNA, para os perfis 1 a 16, obtidos pelo método RAPD com o iniciador UBC 127	93
Figura 13 - Representação gráfica dos padrões de bandas do DNA, para os perfis 1 a 13, obtidos pelo método PFGE, após digestão com a enzima de restrição <u>Sma</u> I	100
Figura 14 - Representação gráfica dos padrões de bandas do DNA, para os perfis 1 a 5, 13 e 8, obtidos pelo método PFGE, após digestão com a enzima de restrição <u>Apa</u> I	105
Figura 15 - Representação gráfica dos padrões de bandas do DNA, para os perfis 9, 11, 6, 14, 15, 7, 10 e 12, obtidos pelo método PFGE, após digestão com a enzima de restrição <u>Apa</u> I	106
Figura 16 - Representação esquemática da linha de processamento industrial de camarão rosa (<i>Penaeus brasiliensis</i>) indicando as 4 áreas em que a mesma foi dividida	111

1. Introdução

L. monocytogenes é um microrganismo conhecido já há muito tempo como causador de doenças em animais, mas o seu reconhecimento como importante patógeno humano, de origem alimentar, deu-se no início dos anos 80, após surtos de listeriose ocorridos na América do Norte e na Europa e, epidemiologicamente, ligados a alimentos. A letalidade destes surtos foi muito alta (25 - 30%) com a infecção ocorrendo principalmente em mulheres grávidas, seus fetos e pessoas imuno-deficientes. Após estes surtos, as indústrias processadoras de alimentos foram alertadas para a importância da ocorrência deste microrganismo em seus produtos.

A taxonomia do gênero *Listeria* ainda causa alguma confusão. Segundo FARBER & PETERKIN (1991) o gênero *Listeria* seria composto por 7 espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. grayi* e *L. murrayi*. *L. denitrificans*, anteriormente pertencente ao gênero, havia sido reclassificada no gênero *Jonesia*, como *Jonesia denitrificans*.

JONES (1992) informa que estudos utilizando o sequenciamento do gene 16S rRNA e a eletroforese de enzima multilocos detectaram a existência de 2 sub-espécies de *L. ivanovii*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* e *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*. Informa, ainda, que estudos semelhantes, empregando biologia molecular, também confirmaram a classificação de *L. grayi* e *L. murrayi* em uma única espécie, *L. grayi*. Desta maneira, aceita-se hoje que o gênero seja formado por 6 espécies, representando 2 linhas de descendência muito relacionadas, porém distintas: i) *L.*

monocytogenes, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, *L. welshimeri*, ii) *L. grayi*.

As bactérias do gênero *Listeria* são Gram positivas, não esporogênicas, móveis a 30°C e altamente adaptadas ao ambiente. Algumas características fenotípicas do gênero estão relacionadas na Tabela 1.

A sorotipagem de *Listeria* está baseada em 15 antígenos somáticos ("O") e 5 flagelares ("H"), sendo 16 as sorovares reconhecidas para as 5 espécies de *Listeria* do grupo i). A espécie *L. grayi* (anteriormente *L. grayi* e *L. murrayi*) contem antígenos O e H específicos (SEELIGER & JONES, 1986).

Dentre as espécies de *Listeria*, *L. monocytogenes* é a única reconhecidamente patogênica ao homem e a animais, sendo que a listeriose animal afeta principalmente bovinos e ovinos.

Listeria está amplamente distribuída na natureza e seu reservatório é uma interação complexa entre solo, material em decomposição, silagem e animais infectados, principalmente ovinos, caprinos, bovinos, aves domésticas e silvestres. *L. monocytogenes* já foi isolada de mais de 37 espécies de mamíferos e 17 espécies de aves, do trato intestinal de humanos saudáveis, de roedores, suínos e aves, de peixes, crustáceos, solo, entre outras fontes (McCARTHY, 1990)

Dentre suas características metabólicas e fisiológicas, destacam-se sua capacidade em crescer a temperaturas de refrigeração (5°C) bem como a 40°C; capacidade de sobreviver a elevadas concentrações de cloreto de sódio e nitritos; capacidade de sobreviver a vários antibióticos e sua capacidade de crescer numa ampla faixa de pH (entre 4,3 e 9,6). Estas características,

Tabela 1- Características diferenciais das espécies de *Listeria*^a

Características	<i>Listeria</i>						
	<i>monocy</i>	<i>innocua</i>	<i>seeligeri</i>	<i>ivanovii</i>		<i>welshi-</i>	<i>grayi</i>
	<i>togenes</i>			subsp. <i>ivanovii</i>	subsp. <i>londoniensis</i>	<i>meri</i>	
β-hemólise	+	-	+	+	+	-	-
Camp teste:							
<i>S. aureus</i>	+	-	+	-	-	-	-
<i>R. equi</i>	-	-	-	+	+	-	-
Patogenicidade a camundongos	+	-	-	+	+	-	-
Fermentação de:							
Manitol	-	-	-	-	-	-	+
Xilose	-	-	+	+	+	+	-
Ramnose	+	v	-	-	-	v	v
Ribose ^b				+	-		
N-acetil-β-manosamina ^b				-	+		
Redução de nitrato	-	-	-	-	-	-	v

+, positivo; -, negativo; v, variável

^a modificado de SEELIGER & JONES, 1986

^b segundo BOERLIN et alii., 1992

incomuns para bactérias não esporuladas de importância na veiculação de doenças de origem alimentar, tornam as bactérias do gênero *Listeria* um microrganismo de particular importância para a indústria de alimentos (RYSER & MARTH, 1991).

Outra característica importante é a capacidade que *L. monocytogenes* possui de formar biofilmes em várias superfícies, ou aderir a biofilmes já existentes, o que dificulta a sua remoção por detergentes ou sanificantes (ARCHER, 1990).

A existência de portadores humanos assintomáticos é reconhecida e pode ser de grande importância na perpetuação e disseminação da doença (RECOMENDATIONS, 1991). Segundo FARBER & PETERKIN (1991), aproximadamente 5 a 10 % da população é portadora de *Listeria* spp.

A importância das mãos na transmissão de microrganismos patogênicos aos alimentos também não deve ser menosprezada. *L. monocytogenes* pode sobreviver por 1 hora nas mãos, quando suspensa em solução salina e por até 5 horas quando suspensa em leite (SNELLING et alii., 1991). KERR et alii. (1993) verificaram que 12% das mãos dos 99 manipuladores de alimentos examinados continham *Listeria* spp. e que 7% continham *L. monocytogenes*, enquanto nenhuma das amostras colhidas das mãos de trabalhadores de escritórios foi positiva.

Um grande número de pesquisas vem sendo realizado a fim de caracterizar o microrganismo, definir os fatores de risco associados à doença e definir estratégias para o controle de *L. monocytogenes* (GELLIN & BROOME, 1989).

A incidência e o comportamento de *L. monocytogenes* e outras listérias em alimentos têm sido bastante estudados, com um

grande número de trabalhos publicados, conforme levantamentos feitos por FARBER & PETERKIN (1991) e RYSER & MARTH (1991).

Os grupos de alimentos que mereceram maior atenção por parte dos pesquisadores foram leite e derivados, carne e derivados, ovos e hortaliças (FARBER & PETERKIN, 1991; RYSER & MARTH, 1991). Com relação aos peixes e frutos do mar, o número de pesquisas é inferior aos demais produtos, mas a retenção destes na América do Norte e na Europa, devido a presença de *L. monocytogenes* é comum (SMOKED, 1989; RYSER & MARTH, 1991, McCARTHY, 1992; CHEESE, 1993a; CHEESE, 1993b; FDA, 1993; *LISTERIA*, 1993).

Levantamentos feitos nos EUA indicam que, mesmo sendo uma doença sub-relatada, anualmente ocorrem 2000 casos de listeriose com 450 mortes. A incidência da doença é semelhante nas diferentes áreas geográficas do país e, apesar de haver maior número de casos durante o verão, estes ocorrem durante todo o ano (RECOMMENDATIONS, 1991).

Na Suíça também observou-se a não ocorrência de sazonalidade da doença, nem distribuição geográfica particular (BILLE, 1991).

Os frutos do mar foram os principais responsáveis pela transmissão de doenças de origem alimentar nos EUA, tanto no período de 1977 a 1984 como no período 1983-1987, tendo sido incriminados em 24,8% dos surtos no primeiro período e em 22,4% no segundo (BRYAN, 1988; ZOTTOLA & SMITH, 1991).

Surto e casos esporádicos de listeriose provocados por frutos do mar têm sido relatados. O primeiro deles, publicado em 1980 por VILDE et alii., sugere que uma mulher imunocomprometida contraiu listeriose após a ingestão de ostras contaminadas.

Em 1980 em Auckland, Nova Zelândia, um surto de listeriose foi epidemiologicamente ligado ao consumo de frutos do mar crus (LENNON et alii., 1984). Este surto resultou em 22 casos da doença e 5 mortes.

FACINELLI et alii. (1989) relataram, na Itália, o isolamento de *L. monocytogenes* a partir de peixe cozido no vapor e consumido por uma mulher que desenvolveu meningite causada por *Listeria*.

RIEDO et alii. (1990, 1994) relataram que camarões importados pelos EUA foram veículo de transmissão de *L. monocytogenes* em dois casos de doença.

Num estudo epidemiológico realizado na Dinamarca verificou-se a presença de linhagens de *L. monocytogenes* pertencentes a um mesmo fagovar, em amostras clínicas de um paciente com listeriose e em ovas de bacalhau, defumadas (FREDERIKSEN, 1991).

Na Nova Zelândia, o consumo de mexilhões foi relacionado a casos de listeriose (MUSSELS, 1993).

A presença de *Listeria* em peixes, mariscos e crustáceos tem sido avaliada por diversos pesquisadores. GRAY & KILLINGER (1966) isolaram *Listeria* spp. de trutas arco-iris. WEAGANT et alii. (1988) examinaram frutos do mar congelados, provenientes de vários países, com relação a presença das diversas espécies de *Listeria*. Das 57 amostras examinadas, 35 foram positivas para *Listeria* e 15 destas positivas para *L. monocytogenes*. As amostras positivas para *L. monocytogenes* foram as de camarão cru, camarão cozido, carne de caranguejo cozida, caudas de lagosta, "surimi" e peixes.

Em 1988, ARCHER apresentou dados sobre a ocorrência de *Listeria* em alimentos examinados pela Food and Drug Administration - FDA dos Estados Unidos, no período de julho a outubro de 1987. Das

74 amostras de camarões crus congelados, importados de diversos países, *L. monocytogenes* foi isolada de 4 (5,4%), sendo uma destas amostras importada do Brasil.

Na Índia, FUCHS & SURENDRAN (1989) avaliaram a presença de *Listeria* em pescados frescos, congelados e pescados salgados. *Listeria innocua* foi isolada em 30 % das amostras e *L. monocytogenes* não foi detectada.

Num estudo para avaliação de meios de isolamento para *Listeria* spp., BUCHANAN et alii. (1989) isolaram *Listeria* spp. a partir de 5 das 18 amostras de frutos do mar examinadas. *L. monocytogenes* pode ser isolada em 2 das amostras de peixe refrigerado (linguado e "monkfish").

Na França, HANGARD-VIDAUD et alii. (1989) avaliaram a ocorrência de *Listeria* em 54 amostras de trutas, constatando a presença em 5 amostras, sendo 3 delas positivas para *L. monocytogenes*.

Em 1990, WONG et alii. pesquisaram, em Taiwan, *L. monocytogenes* em uma grande variedade de produtos, entre eles peixes, lulas e caranguejos. Das 57 amostras de frutos do mar examinadas 6 (10,5 %) foram positivas para a espécie e todas as amostras de caranguejo foram negativas.

Em pesquisas de recuperação de *L. monocytogenes* termo-injuriada em camarões contaminados artificial e naturalmente, MCCARTHY et alii. (1990) relatam a ocorrência de 10^3 - 10^4 UFC de *L. monocytogenes*/g em 2 das amostras dos produtos naturalmente contaminados, e de 10^3 - 10^5 UFC de *L. innocua*/g nas demais amostras examinadas.

Avaliando a presença de espécies de *Listeria* no ambiente estuarino costeiro da Califórnia, COLBURN et alii. (1990) verificaram que apenas 1 das 35 amostras de ostras examinadas foi positiva para *Listeria* (*L. innocua*).

JEMMI (1990) analisou 377 amostras de peixes marinados e defumados e encontrou 47 positivas para *L. monocytogenes*. Das 100 amostras de peixes defumados, 24 % foram positivas para o microrganismo.

HOFFER & RIBEIRO (1990) isolaram *Listeria* spp. a partir de 7 amostras e *L. monocytogenes* a partir de 4, de um total de 45 amostras de camarões capturados na costa sudeste do Brasil.

A incidência da *Listeria* spp. em camarões, ostras e águas estuarinas foi estudada por MOTES Jr. (1991). Das 74 amostras de camarões coletadas, 8 (11%) foram positivas para *L. monocytogenes*. *Listeria* spp. estava presente em 4 (5%) das 78 amostras de água, sendo 3 delas positivas para *L. monocytogenes*. *Listeria* spp. não foi isolada de ostras.

Frutos do mar crus ou processados, foram estudados por NOAH et alii. (1991). Das 59 amostras de produtos crus e 152 de produtos processados, 29 e 31, respectivamente, foram positivas para *Listeria* spp..

HARTEMINK & GEORGSSON (1991) isolaram *Listeria* spp. em 14 (56%) das 25 amostras de peixe cru, em 9 (29%) das 31 amostras de peixe defumado, em 1 (9%) das 11 amostras de camarões e de 12 (32%) das 37 amostras de saladas de frutos do mar por eles analisadas. *Listeria* spp. não foi isolada das amostras de peixes secos, de moluscos ou de pasta de peixes. Por outro lado, *L. monocytogenes* estava presente em 6 (24%) amostras de peixes

crus, 1 (9%) amostra de camarão e em 2 (6,5%) amostras de peixe defumado e em 7 (19%) amostras de saladas. Todos os produtos examinados haviam sido produzidos na Islândia e destinavam-se ao mercado interno daquele país.

FARBER (1991) examinou 113 amostras de frutos do mar "prontos para o consumo" ("ready to eat") colhidas no atacado e 41 amostras colhidas em supermercados de Ottawa, Canada. *L. monocytogenes* foi isolada em 15 amostras do primeiro grupo e em 5 do segundo.

O "ceviche", iguaria típica de alguns países da América do Sul preparada com peixes marinados em suco de limão, foi objeto de estudo por FUCHS & SIRVAS (1991). Das 32 amostras testadas, *L. innocua* foi isolada de 24 (75%) e *L. monocytogenes* de 3 (9%). O pH das amostras positivas para *L. monocytogenes* foi de 4,0 e 4,4; 4,2 e 4,5 e 4,5 e 4,6 para a marinada e o peixe, respectivamente.

RORVIK & YNDESTAD (1991) estudaram a incidência de *L. monocytogenes* em diversos produtos comercializados na Noruega e verificaram que das 57 amostras de frutos do mar, 7 (12,3%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Das 16 amostras examinadas de camarão descascado, e em salmoura, 3 (19%) foram positivas para a espécie.

GILBERT (1991) relata a ocorrência de *L. monocytogenes* em 17 (37%) de um total de 46 amostras de peixes ou produtos de peixe crus examinadas, e em 12 (3%) das 346 amostras de peixes e derivados cozidos examinadas no Reino Unido.

Amostras de peixes defumados comercializados em Newfoundland, Canada, foram testadas para a presença de *Listeria*

spp., por DILLON et alii. (1992) sendo que *Listeria* foi isolada em 11,3% das amostras.

RYU et alii. (1992) examinaram alimentos comercializados em Tóquio e arredores, com relação a presença de *Listeria* spp.. *L. monocytogenes* foi isolada de 7 (6,1%) das 114 amostras de peixe e derivados examinadas, incluindo alimentos "prontos para o consumo".

Também em Tóquio, MASUDA et alii. (1992) examinaram um total de 683 amostras de frutos do mar "in natura". *L. monocytogenes* pode ser isolada em 2,4 % das 382 amostras de peixes, em 1,4% das 70 amostras de camarões, e em 1,4 % das amostras de moluscos (que não ostras). *Listeria* spp. não foi isolada a partir das 84 amostras de ostras examinadas.

Em Barcelona, Espanha, de SIMÓN et alii. (1992) verificaram a incidência de *Listeria* spp. em 311 amostras de produtos alimentícios crus, adquiridos no varejo, sendo 40 destas amostras correspondentes a moluscos bivalvos (mexilhões). *L. monocytogenes* foi isolada a partir de 7,5 % dos bivalvos.

HUDSON et alii. (1992) pesquisaram, na Nova Zelândia, a incidência de *Listeria* spp. em 50 amostras de pescado "prontos para consumo", sendo 25 amostras de peixes e as demais de moluscos. *L. monocytogenes* foi isolada a partir de 8 (32%) amostras do primeiro grupo e de 5 (20%) do segundo.

DECASTELLI et alii. (1993) avaliaram a incidência de *Listeria* spp. em amostras de mexilhões, antes e após depuração (175 e 110 amostras, respectivamente). Apenas 1 das amostras, coletada antes da depuração, foi positiva para *Listeria* spp. (*L. innocua*).

Num estudo comparativo entre os diferentes métodos analíticos para isolamento de *Listeria* em alimentos, RAVOMANANA et alii. (1993) isolaram, na França, *L. monocytogenes* em 11,8 % das 17 amostras de camarões crus e em 11,4 % das amostras de camarões cozidos examinadas.

Em 1993, ADESIYUN estudou, em Trinidad, West Indies, a prevalência de *Listeria* spp., entre outras bactérias, em carnes e frutos do mar "in natura". Dentre as 61 amostras de peixes examinadas, 9 (14,8 %) foram positivas para *Listeria* spp., e dentre as 41 amostras de camarão, *Listeria* spp. pode ser isolada a partir de 2 (4,9 %). *L. monocytogenes* esteve presente em 2 (2,0 %) das 102 amostras examinadas.

DILLON et alii. (1994) examinaram 258 amostras de peixes defumados e isolaram *Listeria* spp. em 43 (16,7 %) das amostras e *L. monocytogenes* em 12 (27,9 %) destas. As amostras positivas para *L. monocytogenes* foram de bacalhau e arenque.

KAMAT & NAIR (1994) estudaram, na Índia, a incidência de diferentes espécies de *Listeria* em frutos do mar frescos, congelados ou secos e em amostras de carnes. Camarões frescos, congelados ou secos representavam 21% das amostras examinadas. Dentre as cepas isoladas, houve predomínio de *L. grayi* e *L. innocua*, enquanto que *L. monocytogenes* não foi isolada.

GECAN et alii. (1994) avaliaram o perfil microbiológico, de sujidades e decomposição de camarões frescos e congelados, domésticos ou importados pelos EUA. Eles verificaram a ocorrência de *Listeria* spp. em 6,8% das 205 amostras examinadas para o microrganismo, tendo *L. monocytogenes* sido isolada a partir de 9 (2,9%) amostras.

Na Irlanda, SHERIDAN et alii. (1994) verificaram a incidência de *Listeria* em diversos alimentos adquiridos no varejo. Dentre as 20 amostras de "fish fingers" examinadas, 3 foram positivas para *L. monocytogenes*.

GOHIL et alii. (1995) estudaram a incidência de *Listeria* spp. em vários alimentos comercializados nos Emirados Árabes Unidos. Dentre as 44 amostras de peixe fresco examinadas, apenas 2 foram positivas, sendo que somente *L. innocua* foi isolada.

A detecção de *L. monocytogenes* em uma usina processadora de alimentos é causa de preocupação, pois uma vez instalada a infecção o microrganismo poderá sobreviver por um período longo, principalmente se a temperatura ambiente for baixa e componentes do alimento propiciarem proteção ao mesmo (PALUMBO & WILLIAMS, 1990).

RYSER & MARTH (1991) observaram que as indústrias não transmitem para a comunidade científica informações sobre a incidência de listérias e de outros microrganismos nas instalações industriais e nos produtos finais, provavelmente devido ao temor da publicidade negativa e potencial perda monetária que poderiam resultar do extravasamento deste tipo de informação. Assim sendo, um número restrito de levantamentos sobre a incidência de *Listeria* em instalações industriais tem sido realizado e publicado por cientistas, inspetores governamentais ou empresas de assessoria.

Em 1987, Flowers (MEAT, 1987) relatou os resultados de uma pesquisa onde aproximadamente 2300 amostras ambientais, colhidas em 40 indústrias processadoras de carnes dos EUA foram avaliadas para a presença de listérias. *Listeria* spp. (incluindo *Listeria*

monocytogenes) foi isolada de 21% das amostras examinadas, representando 14 áreas de processamento. Pisos, drenos, adjuvantes de limpeza, áreas de lavagem, descascadores e superfícies de contato com o alimento foram os pontos que apresentaram maior frequência de positividade para o gênero.

BARNIER et alii. (1988) verificaram, na França, a presença de *Listeria* spp. em amostras ambientais de indústrias processadoras de queijos. Apenas 1 amostra colhida do chão foi positiva para *Listeria monocytogenes* enquanto 9 outras, colhidas de bancadas e rodas de equipamentos (7), escovas (1) e ar (1) foram positivas para *L. innocua*.

Num estudo feito por COX et alii. (1989) na Holanda, 608 amostras coletadas de drenos, piso, água de condensação ou estagnada, resíduos e equipamentos de processamento de 17 indústrias, foram examinadas para a presença de listérias. *Listeria* spp. foi isolada de 181 (29,8%) amostras e *L. monocytogenes* de 27 (4,4%) delas, sendo as amostras de drenos as mais frequentemente contaminadas com *Listeria* spp (54%).

HUDSON & MEAD (1989) determinaram a incidência de *Listeria* spp. em 10 pontos de um abatedouro de frangos, localizado na Inglaterra. *L. monocytogenes* foi isolada a partir de equipamentos, esteiras de transporte e drenos na área de evisceração.

GABIS et alii. (1989) examinaram 410 amostras ambientais provenientes de 18 usinas processadoras de leite em pó, de diferentes regiões dos EUA e encontraram *Listeria* spp. em 2 delas, ambas de drenos, sendo uma positiva para *L. monocytogenes*.

GENIGEORGIS et alii. (1989) avaliaram um total de 188 amostras, colhidas em 12 pontos de um abatedouro de frangos, na

Califórnia. As amostras eram de água, penas, tecidos e órgãos das aves. *Listeria* spp. foi isolada de 20 (10,6%) amostras e *L. monocytogenes* de 6 (3,2%) delas, sendo 3 de água e 3 de carne mecanicamente desossada. Os pesquisadores avaliaram ainda 75 amostras colhidas das mãos de trabalhadores, em 3 pontos da linha de processamento e verificaram a presença de *Listeria* spp. em 35 (46,7%) amostras e *L. monocytogenes* em 28 (34,7%) amostras.

Um total de 584 amostras ambientais, colhidas em 156 usinas processadoras de leite, foi analisado por CHARLTON et alii. (1990). *Listeria* spp. foi isolada em 75 (12,6%) delas e *L. monocytogenes* em 38 (6,4%). As amostras foram colhidas de drenos, água de condensação, esteiras e outros pontos em 4 áreas das usinas.

GENIGEORGIS et alii. (1990) verificaram a prevalência de *Listeria* spp. em um total de 225 amostras colhidas em 10 pontos de um abatedouro de perus, na Califórnia. *Listeria* spp. foi isolada de 12 (5,3%) amostras e *L. monocytogenes* de 5 (2,2%) delas, sendo 1 de água da depenadeira, 2 da água reciclada e 1 de carne mecanicamente desossada. Das 90 amostras colhidas das mãos dos trabalhadores, em 3 pontos da linha de processamento, 27 (30%) possuíam *Listeria* spp. e 11 (12,2%) *L. monocytogenes*.

Uma indústria produtora de salsichas de peru, que haviam sido microbiologicamente ligadas a um caso de listeriose humana, foi avaliada por WENGER et alii. (1990) nos EUA. Das 41 amostras ambientais e de equipamentos examinadas, somente 2 foram positivas para *L. monocytogenes*, sendo 1 colhida do chão e outra de esteira de transporte. Os pesquisadores também coletaram 64 amostras de produto em 6 pontos da linha de processamento, sendo *L. monocytogenes* isolada de 16 delas.

WALKER et alii. (1991) examinaram 922 amostras ambientais colhidas em 39 usinas processadoras de derivados congelados de leite, na Califórnia. *Listeria* spp. foi isolada de 111 (12%) amostras e *L. monocytogenes* de 50 (5,4%). Amostras colhidas de drenos foram as mais frequentemente positivas para *Listeria*, seguidas das de água estagnada, água condensada, piso, correias, "pallet" de madeira e esteiras.

Em Vermont, EUA, KLAUSNER & DONNELLY (1991) avaliaram a presença de *Listeria* e *Yersinia* em 361 amostras ambientais colhidas em 34 usinas processadoras de leite e derivados. Das amostras colhidas do piso e de outras superfícies que não entram em contato com o alimento, 63 (17,5%) foram positivas para *Listeria* e 5 (1,4%) para *L. monocytogenes*. Destas 5 amostras positivas para *L. monocytogenes*, 4 foram colhidas do chão em diferentes áreas das usinas e 1 de caixas de leite.

Os pesquisadores VAN DEN ELZEN & SNIJDERS (1993), na Holanda, examinaram 3 abatedouros de suínos, um de bovinos e uma unidade de distribuição de carnes, em busca de pontos críticos para *L. monocytogenes*. De um total de 843 amostras examinadas, 343 foram ambientais, de utensílios ou equipamentos, e de mãos de operários. Destas, 39 (11,4%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Os autores verificaram um aumento na incidência de *L. monocytogenes* após o resfriamento e corte das carcaças de suínos e concluíram que a contaminação desta carne originava-se do ambiente da câmara de resfriamento ou da sala de corte.

LAWRENCE & GILMOUR (1994) pesquisaram a presença de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em amostras ambientais, colhidas numa indústria processadora de aves na Irlanda do Norte. Do total

de 252 amostras ambientais examinadas, *Listeria* spp. foi isolada de 87 (34,5%) delas e *L. monocytogenes* de 47 (18,7%). Os locais positivos para *L. monocytogenes* foram superfícies de trabalho de aço inoxidável, correias das esteiras, maçanetas de portas, piso, rodos usados para limpar o chão, luvas e drenos. Amostras de ar não apresentaram *Listeria* (<1 UFC/dm³), o que indica não ser o ar uma fonte de contaminação ambiental para a planta em questão.

DYKERS et alii. (1994) estudaram a presença de *Listeria* em amostras de pele de pescoço de frangos e da superfície de 2 equipamentos, em um abatedouro de aves da África do Sul. Linhagens de *L. monocytogenes* foram isoladas a partir das amostras colhidas nas depenadeiras e no funil de empacotamento, bem como de amostras de produto final.

Apesar do razoável número de trabalhos sobre a incidência de *Listeria* spp. em peixes e frutos do mar crus ou processados, apenas 3 pesquisas foram realizadas até o presente, voltadas para o estudo deste grupo de microrganismos em indústrias processadoras destes alimentos.

Segundo RYSER & MARTH (1991), entre janeiro e abril de 1988, inspetores do Departamento de Agricultura de Oregon, EUA, analisaram 480 amostras ambientais de 17 instalações processadoras de frutos do mar daquele estado americano. Apesar de somente 4% das amostras serem positivas para *Listeria* spp., 10 das 17 usinas apresentaram *Listeria* em seu ambiente sendo as mesmas isoladas de drenos, equipamentos e acesórios, salmouras e fezes de gaivota de área externa.

FUCHS & REILLY (1992) referem-se a um trabalho de Fuchs, não publicado, onde avaliou-se a incidência de *Listeria* em uma usina processadora de camarões em país asiático. Segundo eles, *L. innocua* foi isolada com maior frequência que *L. monocytogenes* de vários locais, incluindo caixas, bandejas, mesas de processamento, balanças, pisos, drenos e botas dos trabalhadores.

Com a finalidade de determinar as rotas de contaminação de trutas defumadas, JEMMI & KEUSCH (1994) analisaram a presença de *Listeria* spp. em 3 fazendas produtoras de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) da Suíça, e nas unidades de defumação associadas a elas. Do total de 590 amostras colhidas, 102 (17,3%) foram positivas para *Listeria* spp. e 65 (11%) para *L. monocytogenes*. As 246 amostras ambientais examinadas foram colhidas de superfícies de equipamentos, aventais, mãos de manipuladores, ganchos de defumadores, estufas de defumação, drenos e pisos. Destas, 36 (14,6%) foram positivas para *L. monocytogenes*, tendo todas sido coletadas em uma mesma unidade processadora. Apenas 1 das 49 amostras de produto final estava contaminada por *L. monocytogenes*, sendo ela proveniente da mesma usina que apresentou contaminação ambiental. Os pesquisadores relacionaram a presença de *Listeria* às condições higiênicas deficientes da usina e ao fornecimento de alimento aos animais antes do abate.

A amostragem ambiental e de produto, ao longo da linha de processamento, é uma forma de localizar áreas relacionadas à contaminação do alimento e revelar condições gerais do ambiente de processamento. Mas para melhor detectar as fontes de

contaminação, a tipagem das linhagens encontradas deve ser realizada. A ligação epidemiológica entre as linhagens isoladas de uma linha de processamento permite que os locais onde uma linhagem aparece e desaparece sejam determinados, revelando as etapas que contribuem para a contaminação final do alimento (DODD, 1994).

Dentre os diversos sistemas de tipagem existentes, a biotipagem e a sorotipagem são os mais empregados mas não apresentam suficiente poder discriminatório.

L. monocytogenes apresenta 13 sorovares, todos patogênicos ao homem, mas são aqueles microrganismos pertencentes aos sorovares 1/2a, 1/2b e 4b os causadores da maior parte dos casos de listeriose humana ao redor do mundo (FARBER & PETERKIN, 1991). Poucos são os estudos sobre a distribuição dos sorovares de *L. monocytogenes* em frutos do mar, mas os sorogrupos 1 e 4 predominam nestes alimentos (WEAGANT et alii., 1988; HANGARD-VIDAUD et alii., 1989; WONG et alii., 1990; RORVIK & YNDESTAD, 1991; de SIMÓN et alii., 1992; ADESIYUM, 1993; DILLON et alii., 1994; JEMMI & KEUSCH, 1994). Assim, devido ao pequeno número de sorovares usualmente encontrados, a sorotipagem para *L. monocytogenes* tem sua utilização limitada.

A fagotipagem é mais sensível que as tipagens anteriores e permite a distinção entre linhagens pertencentes a um mesmo sorogrupo, ou mesmo sorovar, mas ainda assim é freqüente a existência de linhagens não tipáveis (McLAUHLIN et alii., 1986). A percentagem de cepas de *L. monocytogenes* fagotipáveis variou entre 52 e 78 % em vários estudos realizados (AUDURIER & MARTIN, 1989). Sabe-se que existe uma relação entre o sorovar e o fagovar

de uma linhagem, sendo as linhagens do sorogrupo 1/2 ou do 4, tipadas somente por fagos específicos para cada um dos grupos (ORTEL, 1989). Atualmente, o conjunto de bacteriófagos recomendado internacionalmente para a fagotipagem é composto por 26 fagos divididos em 2 grupos: 10, 19, 21, 43, 46, 387, 575, 1652, 1967, 2685, 4477 e 12029 para a fagotipagem das linhagens pertencentes ao sorogrupo 1/2 e 47, 52, 107, 108, 312, 340, 1317, 1444, 2389, 2425, 2671, 3274, 3551 e 3552 para a fagotipagem das cepas do sorogrupo 4 (MARQUET-van der MEE & AUDURIER, 1995). A execução da fagotipagem é outro fator limitante para seu emprego pois exige laboratórios especializados, sendo poucos aqueles que a realizam rotineiramente.

Avanços nos estudos de biologia molecular propiciaram o desenvolvimento e emprego de vários métodos de tipagem molecular. Alguns destes métodos utilizam-se de características genotípicas e outros de características fenotípicas, como é o caso da separação eletroforética de enzimas multilocos - MEE.

MEE permite detectar diferenças na mobilidade eletroforética de enzimas metabólicas constitutivas, produzidas pelas bactérias. As enzimas são separadas por eletroforese em gel de amido e são individualmente detectadas com o uso de substratos específicos (SELANDER et alii., 1986). Como MEE avalia a expressão fenotípica, podem ocorrer variações na expressão do gene devido a condições de cultura e sub-cultura (VERSALOVIC et alii., 1993). Mesmo assim, diversos pesquisadores têm empregado, com sucesso, o método para tipagem de *L. monocytogenes* (BIBB et alii., 1990; NORRUNG & SKOVGAARD, 1993; GRAVES et alii., 1994; HARVEY & GILMOUR, 1994).

Métodos genotípicos referem-se a caracterização do DNA cromossômico, plasmidial ou total de um microrganismo, características estas relativamente estáveis. Dentre os métodos genotípicos, pode-se ressaltar a análise do perfil plasmidial (MAYER, 1988), a análise do DNA cromossômico após digestão por enzima de restrição -REA- (JORDENS, 1991), e a reação de polimerização em cadeia - PCR (EISENSTEIN, 1990).

A análise do perfil plasmidial origina boas informações epidemiológicas mas, por serem os plasmídeos elementos extra-cromossômicos, eles podem ser espontaneamente perdidos ou ganhos por uma linhagem hospedeira. Assim sendo, a análise do perfil plasmidial é mais eficiente em estudos restritos em termos de tempo e lugar (MASLOW et alii., 1993).

Segundo MACGOWAN et alii. (1993) a análise do perfil plasmidial é de pouco valor para bactérias com baixa incidência de plasmídeos, como é o caso de *L. monocytogenes*. Estes autores informam que no Reino Unido, apenas 1,7 % das linhagens de *L. monocytogenes* isoladas apresentam plasmídeos. Em outros países essa incidência é mais elevada, e diversos pesquisadores têm empregado este método com sucesso para a tipagem de *Listeria* spp. (PÉREZ-DÍAZ et alii., 1982; FISTROVICI & COLLINS-THOMPSON, 1990; KOLSTAD et alii., 1991; KOLSTAD et alii., 1992; DYKES et alii., 1994).

A análise do DNA cromossômico após digestão por enzima de restrição (REA) tem sido usada há vários anos como ferramenta epidemiológica para o estudo de surtos de doenças de origem viral ou bacteriana. Uma endonuclease de restrição corta enzimaticamente ("digere") o DNA em uma seqüência específica

("restrita") de reconhecimento de nucleotídeos. O número e o tamanho dos fragmentos gerados refletem a frequência e a distribuição destes sítios de restrição (MASLOW et alii., 1993).

A análise do DNA genômico pode ser feita empregando-se endonucleases de restrição que clivam o DNA tanto em regiões encontradas frequentemente, como naquelas infrequentes.

Quando endonucleases com alta frequência de corte são empregadas, um grande número de fragmentos variando entre 0,5 kb e 50 kb de comprimento são gerados. Estes fragmentos podem ser separados, por tamanho, com eletroforese clássica em gel de agarose e os padrões determinados após coloração do gel com brometo de etídio e fotografia sob luz ultravioleta (MASLOW et alii., 1993).

A maior limitação desta técnica está na dificuldade de interpretação visual dos perfis originados, que são compostos por centenas de bandas que podem estar sobrepostas ou podem não ser bem resolvidas. Para facilitar a comparação, alguns pesquisadores transferem os fragmentos de restrição, já separados, para uma membrana de nitrocelulose ("Southern Blot") e usando como sonda fragmentos de DNA marcados, detectam seqüências homólogas às da sonda. Estas sondas podem ser derivadas de genes específicos para fatores de virulência (TENOVER, 1988) ou de genes que codificam para a produção de RNA ribossômico - rRNA (GRIMONT & GRIMONT, 1986). As sondas podem ainda ser seqüências aleatórias de DNA (TOMPKINS et alii., 1986). Quando a sonda empregada é um rRNA, o método é chamado ribotipagem.

A ribotipagem está baseada na presença de 3 a 5 cópias dos genes ribossomais no DNA bacteriano. Estes genes contem

seqüências altamente conservadas dentro dos gêneros ou famílias bacterianas. Na ribotipagem, 16S e 23S rRNA marcados são usados como sonda e cada fragmento do DNA contendo o gene ribossômico será destacado dos demais, originando um número menor de bandas que podem ser mais facilmente comparadas (TOMPKINS, 1992). Sistemas automatizados, como o RiboPrint™ da DuPont, executam este tipo de tipagem.

A tipagem de *L. monocytogenes* empregando a análise dos fragmentos de restrição gerados por endonucleases de alta frequência de corte tem revelado alto poder discriminatório (CASOLARI et alii., 1990; NOCERA et alii., 1990; SZABO & DESMARCHELIER, 1990; WESLEY & ASHTON, 1991). CASOLARI et alii. (1994) empregaram REA para confirmar um caso de listeriose neonatal, de origem alimentar. Os pesquisadores examinaram cepas de *L. monocytogenes* provenientes de alguns alimentos existentes na casa da mãe e cepas provenientes do sangue do bebê, fluído amniótico, e de amostras vaginais e retais da mãe e verificaram que os isolados clínicos apresentaram o mesmo padrão de DNA, após digestão com Eco RI, que as amostras provenientes das azeitonas em conserva.

Alguns pesquisadores implementaram ainda mais este poder discriminatório empregando como sonda, seqüências aleatórias do DNA de *L. monocytogenes* (LEW & DESMARCHELIER, 1992; HARVEY & GILMOUR, 1994) ou o gene 16S+23S rRNA (BALOGA & HARLANDER, 1991; GRAVES et alii., 1991; CZAJKA et alii., 1993, GRAVES et alii., 1994; PIMENTA, 1995) ou ainda, seqüências de DNA específicas para *L. monocytogenes* (BROSCH et alii., 1994a).

Quando se emprega para a digestão do DNA endonucleases de baixa frequência de corte, são gerados de 5 a 25 fragmentos com pesos moleculares variando entre 10 e 2000 kb. Estes fragmentos não podem ser resolvidos por eletroforese clássica, sendo necessário o emprego da eletroforese em gel de campo pulsante - PFGE - ("pulsed-field gel electrophoresis") (LAI et alii., 1989; MASLOW et alii., 1993).

PFGE é um método derivado da eletroforese convencional do DNA, em gel de agarose, sendo a principal diferença a mudança repetida da orientação do campo elétrico. Esta mudança provoca o re-arranjo da estrutura conformacional da molécula, permitindo a sua migração no gel. Esta movimentação obedece ao seguinte princípio: quando um campo elétrico é aplicado ao gel, as moléculas de DNA se alongam na direção do campo e migram no gel. Quando o primeiro campo é removido e um segundo é aplicado com certo ângulo em relação ao primeiro, a molécula de DNA deve mudar a sua conformação e re-orientação antes que ela possa migrar na direção do segundo campo elétrico (LAI et alii., 1989). O tempo necessário para que essa re-orientação ocorra é proporcional ao peso molecular do fragmento, sendo a re-orientação das moléculas maiores mais demorada que a das moléculas menores (LAI et alii., 1989). Diversos são os equipamentos existentes no mercado empregando o campo pulsante, sendo que eles apresentam variações na geometria do campo elétrico.

A técnica empregada para digestão do DNA por enzima de restrição de baixa frequência de corte é diferente daquela empregada para REA. Na técnica convencional, inicialmente faz-se a digestão enzimática da parede celular e/ou membranas, e de

toda a proteína celular, pelo emprego de proteinase K, na presença de detergente e EDTA (para inibir a atividade de nucleases endógenas). As moléculas de DNA preparadas por este método tem, em geral menos de 500 kb devido a quebras mecânicas. Para evitar estas quebras e obter DNA íntegro para digestão por enzima de baixa frequência de corte, as células são aprisionadas em agarose, antes da lise. A agarose mantém as moléculas de DNA intactas e ao mesmo tempo permite a difusão de detergente e protease. O DNA de alto peso molecular pode então ser submetido a digestão pela endonuclease de restrição (LAI et alii., 1989).

PFGE tem sido empregado para caracterização de diversos microrganismos (ALLARDET-SERVENT et alii., 1989; ARBEIT et alii., 1990; SOLDATI & PIFFARETTI, 1991; HARSONO et alii., 1993; POWELL et alii., 1994; DONABEDIAN et alii., 1995).

VICENTE et alii. (1989) num estudo de mapeamento de cromossomo de *Listeria*, empregaram 23 enzimas de restrição para digestão do DNA. No resumo do trabalho eles afirmam que as enzimas Eco RI e Hind III mostraram-se as mais eficientes mas, no texto, descrevem a eficiência de Not I. Not I gerou 6 fragmentos que puderam ser resolvidos por PFGE e hibridizados com sonda de DNA correspondente ao gene hlyA que codifica para produção de hemolisina. Os pesquisadores empregaram o sistema FIGE ("field inversion gel electrophoresis" - eletroforese em gel com inversão de campo).

CARRIERE et alii. (1991) avaliaram o polimorfismo do DNA de 25 linhagens de *L. monocytogenes* de diversas origens, pertencentes aos sorovares 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b, após a digestão do DNA com Apa I e Not I. As cepas dos sorovares 1/2a e 1/2b apresentaram

maior polimorfismo enquanto as cepas dos sorovares 1/2c e 4b foram mais homogêneas. Este trabalho foi o primeiro a empregar, para eletroforese, o equipamento CHEF ("clamped homogeneous electric field" - campo elétrico homogêneo e restrito).

PFGE foi usado por BROSCHE et alii. (1991a) para comparar 42 linhagens de *L. monocytogenes* sorovar 4b, de diferentes origens e fontes. Empregando as enzimas Apa I, Sma I e Not I e o sistema FIGE, os pesquisadores obtiveram 16 perfis de macro-restrição com as 2 primeiras enzimas e 7 com a terceira, tendo sido gerados de 15 a 18 fragmentos com Apa I e de 3 a 7 com Not I. Não foi possível relacionar os perfis de DNA encontrados com os fagovares previamente determinados para as cepas estudadas. Os pesquisadores verificaram ainda que as amostras de diferentes fontes e países podem apresentar o mesmo perfil de restrição com 1, 2 ou mesmo 3 enzimas. Os autores enfatizam ainda a importância do emprego de pelo menos 3 enzimas para a avaliação dos perfis de DNA.

BUCHRIESER et alii. (1991) avaliaram os perfis de macro-restrição de 35 linhagens de *L. monocytogenes*, pertencentes aos sorogrupos 1/2 e 3, isoladas de diversas fontes e em diversos países, gerados pela digestão do DNA com Apa I, Sma I e Not I e resolvidos com o sistema FIGE. A combinação destes perfis permitiu a definição de 24 grupos distintos de linhagens. Não houve correlação entre os perfis de restrição e os sorovares.

Os perfis de restrição obtidos pela digestão enzimática, seguida de PFGE, do DNA de 25 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de casos clínicos e de alimentos na Áustria, foram comparados por BROSCHE et alii. (1991b). Dezesesseis perfis foram

obtidos com as enzimas Apa I e Sma I sendo que os isolados humanos apresentaram perfis diferentes daqueles dos isolados de alimentos. Linhagens inicialmente consideradas semelhantes, por serem da mesma sorovariedade e fonte, apresentaram perfis de macro-restrição diferentes. O sistema empregado para eletroforese foi o FIGE.

HOWARD et alii. (1992) empregaram PFGE para a diferenciação de linhagens de *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*. O DNA foi digerido com Apa I, Asc I, Sma I ou Not I e revelou diferenças espécie- e sorovar-específicas nos perfis genômicos gerados. A enzima Asc I mostrou-se mais eficiente que as demais enzimas, por gerar fragmentos mais facilmente identificáveis. Nesta pesquisa empregou-se o sistema CHEF, que originou resultados reprodutíveis e permitiu melhor resolução das bandas.

MOORE et alii. (1992) caracterizaram linhagens de *L. monocytogenes* por PFGE, após digestão do DNA com Sma I e verificaram ser possível distinguir perfis diferentes de DNA entre linhagens de mesmo sorovar ou não.

Setenta e cinco cepas de *L. monocytogenes* isoladas de 14 surtos de listeriose de origem alimentar ocorridos em diversos países, foram comparadas por BUCHRIESER et alii. (1993). As cepas puderam ser agrupadas em 20 variedades genômicas diferentes empregando-se Apa I, Sma I e Not I e PFGE com o sistema FIGE. Treze das 19 linhagens isoladas durante os grandes surtos da Suíça (Vaud, 1983-1987), dos EUA (Califórnia, 1985) e Dinamarca (1985-1987) apresentaram padrões de restrição indistintos. Por outro lado, as linhagens responsáveis pelos surtos do Canadá (Nova Escócia, 1981), dos EUA (Massachusetts, 1983), França (Anjou, 1975-1976), Nova

Zelândia (Auckland, 1969) e Áustria (1986) e alguns pequenos surtos caracterizaram-se por combinações específicas de padrões de restrição de DNA.

YAN et alii. (1993) analisaram epidemiologicamente 16 linhagens de *L. monocytogenes* isoladas de amostras clínicas e de alimentos relacionadas a 6 surtos ocorridos na América do Norte e na Europa e 28 linhagens, também de alimentos e espécimes clínicos, isoladas de casos esporádicos de listeriose no Canadá. As 44 linhagens foram digeridas com Apa I e Sma I resultando em fragmentos de tamanho variando entre 20 e 450 kb. As 16 linhagens provenientes dos surtos foram também digeridas com Asc I e apresentaram fragmentos variando entre 30 e 800 kb. Variações intra-específicas nos perfis de restrição obtidos com o PFGE puderam ser usadas para confirmar a transmissão de *L. monocytogenes* de pessoa a pessoa e correlacionar alguns isolados clínicos e de alimentos em casos esporádicos de listeriose. Estes autores utilizaram o sistema CHEF para a eletroforese.

PEREIRA et alii. (1994) analisaram os padrões de macro restrição de 21 linhagens de *L. monocytogenes* isoladas de humanos e de alimentos brasileiros. As enzimas empregadas foram Apa I, Sma I e Not I e a separação das bandas foi feita utilizando-se o sistema FIGE. Após a digestão com Apa I, 12 perfis de restrição foram observados, enquanto que para Sma I e Not I foram observados 11 perfis. A combinação destes perfis de macro-restrição possibilitou a separação das cepas em 12 grupos diferentes.

BROSCH et alii. (1994a) avaliaram o poder discriminatório do CHEF, seguido de hibridização com sondas específicas, na caracterização de *L. monocytogenes*. Linhagens de *L.*

monocytogenes (175) foram digeridas com Sma I, Apa I e Asc I e os fragmentos gerados resolvidos com o sistema CHEF. A seguir os fragmentos foram transferidos para membranas de nylon e hibridizados com as sondas pLUCH 44, pLUCH51 e pLUCH52, que contem seqüências específicas para *L. monocytogenes*. Após a digestão com Sma I, 62 perfis de restrição foram gerados apresentando 10 grupos de hibridização com pLUCH44, 8 com pLUCH51 e 3 com pLUCH52. Os 3 grupos identificados com pLUCH52 estavam correlacionados a grupos antigênicos flagelares, sendo estes resultados semelhantes àqueles verificados com os obtidos pelo emprego de Apa I e Asc I. Esta correlação não foi obtida com as outras 2 sondas.

Um total de 176 linhagens de *L. monocytogenes* foi examinado por BROSCHE et alii. (1994b) empregando as enzimas Asc I e Apa I e o sistema CHEF para eletroforese. Com Asc I foram gerados 63 perfis de restrição, enquanto que com Apa I, 72 perfis foram gerados. A combinação dos resultados originados pelas 2 enzimas gerou 87 grupos genomicamente distintos. Asc I mostrou menor poder discriminatório que Apa I para a sub-tipagem de *L. monocytogenes*, mas permitiu a interpretação mais fácil dos perfis uma vez que gerou menor número de fragmentos (8 a 14) que Apa I (18 a 23 fragmentos). Os resultados indicaram ainda que linhagens de sorovares diferentes e linhagens de um mesmo sorovar podem apresentar perfis de macro-restrição diferentes. Também observou-se que algumas linhagens de sorovares diferentes apresentaram perfis idênticos de macro-restrição.

MOORE & DATTA (1994) avaliaram o perfil de restrição de 24 linhagens de *L. monocytogenes* empregando a enzima de restrição

Sma I e o sistema CHEF para eletroforese. As cepas, pertencentes aos sorovares 1/2a, 1/2b e 4b, eram provenientes de casos clínicos de listeriose humana e de alimentos relacionados a estes casos. Aproximadamente 20 bandas, com pesos moleculares entre 20 e 340 kb puderam ser resolvidas. Pares de linhagens correspondentes, isto é, de caso clínicos e de alimentos de um mesmo episódio, revelaram similaridade sendo que o mesmo não foi observado para linhagens de episódios diferentes.

A descrição da reação de polimerização em cadeia - PCR (MULLIS & FALOONA, 1987) possibilitou um grande avanço nas técnicas de biologia molecular, tendo tal reação se transformado nos últimos anos, de um instrumento de pesquisa altamente especializado em uma técnica rotineira aplicada em diversos laboratórios. Áreas como microbiologia, imunologia, oncologia, genética, medicina forense, transplantes de órgãos entre outras, foram beneficiadas pelo PCR.

A principal característica do PCR é sua capacidade de replicar ("amplificar") *in vitro*, rápida e exponencialmente, uma seqüência específica de DNA (o molde ou "template").

Para que a reação ocorra, necessita-se de: 1) uma pequena quantidade do molde; 2) de uma enzima termoestável, a DNA polimerase; 3) de 2 oligonucleotídeos de aproximadamente 20 bases de comprimento, os iniciadores ou "primers", complementares às seqüências das terminações dos moldes; 4) dos deoxinucleotídeos (dNTPs); 5) tampão de reação e íons magnésio (CLARKE et alii., 1992; MASLOW et alii., 1993). Esta mistura é submetida a variações cíclicas,

e repetidas, de temperatura que propiciarão a síntese de milhões de cópias idênticas ao molde.

Cada ciclo do PCR pode ser dividido em 3 etapas: denaturação, "annealing" ou relaxamento e polimerização. A denaturação é a separação do DNA molde, dupla fita, em fitas simples complementares através da elevação rápida da temperatura para 95°C. Esta denaturação é necessária para que a DNA polimerase possa atuar (EELES & STAMPS, 1993). Após a etapa de denaturação, a reação é rapidamente resfriada a aproximadamente 55°C, o que promove o relaxamento das fitas de DNA permitindo o pareamento dos iniciadores às seqüências complementares do molde. A formação do complexo "iniciador - molde" é altamente dependente da temperatura. À seguir, a temperatura é elevada a aproximadamente 72°C, o que vai propiciar a incorporação, pela polimerase, de nucleotídeos aos iniciadores com a consequente extensão de uma fita de DNA complementar ao molde na região especificada pelos iniciadores. Esta incorporação de nucleotídeos é sempre feita no sentido 5'→3' do DNA. A temperatura é, então, elevada a 95°C e o ciclo repetido (CLARKE et alii., 1992; EELES & STAMPS, 1993). Ao final de cada ciclo, 2 seqüências completas e idênticas de DNA dupla-fita terão sido replicadas. Na figura 1 tem-se a representação esquemática da reação de polimerização em cadeia, segundo CLARKE et alii., 1992.

Após n ciclos ter-se-ia, teoricamente, 2^n cópias da seqüência que está sendo ampliada mas, na prática, sabe-se que somente os primeiros 20 ou 30 ciclos resultam em um aumento exponencial do produto. Após estes ciclos, o acúmulo do produto entra numa fase linear, identificada como platô de amplificação, decorrente do

consumo do substrato, competição dos produtos de amplificação não específicos pela polimerase ou re-associação de fragmentos de DNA fita-simples, antes da extensão completa do iniciador já pareado. A exposição da polimerase, repetidas vezes, a temperaturas de denaturação pode levar a degradação gradual da enzima, o que também pode contribuir para o efeito platô (CLARKE et alii., 1992). Uma reação padrão de PCR tem de 35 a 45 ciclos. O produto da amplificação é resolvido por eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio, e visualizado sob luz ultravioleta.

Vários fatores podem influenciar a eficiência do PCR, cabendo ressaltar entre eles a concentração de íons magnésio, a temperatura de cada ciclo, duração de cada uma das etapas de um ciclo, número de ciclos, concentração dos dNTPs e a concentração da polimerase. Contaminantes presentes na amostra podem inibir a reação (CLARKE et alii., 1992) e enzimas termo-estáveis produzidas por microrganismos podem degradar os produtos da amplificação (NAKAJIMA et alii., 1994).

PCR tem tido seu emprego expandido na análise microbiológica de alimentos. Diversos pesquisadores tem descrito a utilização do método na detecção direta do microrganismo em alimentos (ROSSEN et alii., 1991; THOMAS et alii., 1991; WERNARS et alii., 1991; JENSEN et alii., 1994).

Figura 1 - Representação esquemática da reação de polimerização em cadeia (modificada de CLARKE et alii., 1992).

Da maneira como foi originalmente descrito, o PCR fornecia somente resultados positivos ou negativos. Para torná-lo um sistema de tipagem epidemiológica, diversas variações tem sido desenvolvidas. Uma destas variações originou o método conhecido como RAPD - "Random amplified polymorphic DNA" (DNA polimórfico aleatoriamente amplificado). O RAPD baseia-se no emprego de um único iniciador, pequeno (10 bases), de seqüência de nucleotídeos arbitrária (WELSH & McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et alii., 1990). Quando submetidos ao PCR, estes iniciadores arbitrários irão resultar na amplificação de uma ou mais seqüências de DNA, gerando conjuntos de fragmentos que funcionam como marcadores genéticos. O número e o tamanho destes fragmentos são a base da tipagem de um isolado bacteriano. Na figura 2 tem-se a representação esquemática dos fragmentos gerados com o RAPD.

A principal vantagem do RAPD sobre o PCR tradicional é a possibilidade de detectar polimorfismos do DNA sem necessidade do conhecimento prévio da seqüência de nucleotídeos de um gene relevante ou do DNA alvo. Entretanto, a escolha dos iniciadores que originem resultados reprodutíveis é um pouco trabalhosa (MASLOW et alii., 1993), exigindo muitas vezes o teste de dezenas deles.

Avaliando o poder discriminatório do método, WANG et alii. (1993) desenvolveram uma pesquisa com 75 linhagens de *E. coli* representantes dos 15 principais grupos causadores de diarreia ao redor do mundo. Eles compararam os resultados obtidos com MEE com aqueles obtidos com o RAPD e verificaram que este último permitiu a sub-divisão dos grupos originados por MEE em 3 ou mais sub-grupos distintos. Os pesquisadores concluíram ser o RAPD muito mais sensível que o MEE e recomendam seu emprego no estudo da

a, padrão

b, amostra

Figura 2 - Representação esquemática dos fragmentos gerados pela amplificação de seqüências aleatoriamente distribuídas no cromossomo, empregando-se o método RAPD (modificado de DODD, 1994).

estrutura e evolução genética de populações bacterianas e em epidemiologia.

Os primeiros trabalhos empregando RAPD para a tipagem de *L. monocytogenes* começaram a ser publicados em 1992. MAZURIER & WERNARS (1992) utilizaram RAPD na tipagem de 60 cepas de *Listeria* de diversos biotipos e sorovares. Foram utilizados na amplificação células íntegras e o iniciador HLWL74 (5'-ACG TAT CTG C-3'). Os pesquisadores obtiveram 29 perfis diferentes para as cepas estudadas, com número de bandas variando entre 1 e 12. O emprego do RAPD possibilitou a diferenciação entre linhagens de espécies diferentes e também entre linhagens de uma mesma espécie ou sorovar.

Um total de 104 cepas de *L. monocytogenes* pertencentes ao sorogrupo 1 ou ao sorovar 4b foi submetido ao RAPD e a fagotipagem por MAZURIER et alii. (1992). Destas cepas, 53 haviam sido isoladas durante 6 surtos de listeriose. O iniciador empregado foi o HLWL74 e 38 perfis de DNA foram observados, sendo que cada grupo de linhagens isolado durante um surto apresentou um perfil específico para RAPD. Para 98 % das linhagens isoladas durante surtos houve correlação completa entre RAPD e fagotipagem. Dentre as 51 cepas não ligadas aos surtos, 12 foram relacionadas aos grupos epidêmicos quando RAPD foi empregado e para 2 delas a fagotipagem reforçou esta relação.

A análise dos perfis gerados por RAPD e as diferenças nos genes 16S rRNA de *L. monocytogenes* e *L. innocua* foram comparadas por CZAJKA et alii. (1993). Os pesquisadores verificaram ser muito difícil a separação entre as espécies empregando-se a comparação das seqüências de bases do 16S rRNA, enquanto que

os perfis gerados por RAPD são de fácil interpretação. Polimorfismos foram observados tanto entre sorovares diferentes como em um mesmo sorovar.

MACGOWAN et alii. (1993) empregaram RAPD para tipar cepas de *Listeria* spp. utilizando DNA previamente extraído e um conjunto de 3 iniciadores, o chamado iniciador universal, de 21 pares de bases, e os iniciadores 43423 e 59644, com 20 pares de bases cada. Este método possibilitou a discriminação entre as espécies de *Listeria*. Perfis exclusivos foram obtidos para cada uma das cepas de *L. innocua* e *L. seeligeri* examinadas. Já todas as cepas de *L. ivanovii* mostraram um mesmo perfil. Com as cepas de *L. monocytogenes* foram observados polimorfismos dentro de um mesmo sorovar.

Um total de 91 cepas de *L. monocytogenes* provenientes de alimentos, ambientes de processamento de alimentos e de espécimes humanos e de animais, foram tipadas por LAWRENCE et alii. (1993). Utilizando células lisadas e o iniciador OPM-01 (5'-GTT GGT GGC T-3') os pesquisadores obtiveram 33 perfis com 1 a 10 bandas, cujos pesos moleculares variaram entre 0,5 e 5,0 kb. Perfis específicos foram observados para as linhagens provenientes de cada uma das fontes.

BOERLIN et alii. (1994) tiparam 55 cepas de *L. monocytogenes* epidemiologicamente independentes, utilizando sorologia, ribotipagem, MEE para 9 enzimas, REA com Eco RI e RAPD. Para o RAPD foram empregados 3 iniciadores, sendo um deles o HLWL74, e células parcialmente lisadas. Os resultados indicaram ser o RAPD mais discriminatório que a sorotipagem e equivalente aos demais métodos de tipagem.

CZAJKA & BATT (1994) testaram com o método RAPD, cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras clínicas ou de alimentos, provenientes de 4 surtos de listeriose de origem alimentar, a fim de verificar se a linhagem isolada a partir do alimento e inicialmente tida como causadora do surto, havia sido corretamente identificada. Em 3 dos surtos, os pesquisadores obtiveram com 18 dos 20 iniciadores empregados, perfis idênticos para os pares de cepas alimento-amostra clínica provenientes de um mesmo surto, confirmando o agente causal dos mesmos. Dois dos iniciadores não geraram padrões consistentes. Os pares de cepas do quarto surto apresentaram polimorfismo, indicando que mesmo sendo relacionadas estas cepas são distintas e estáveis. RAPD mostrou ser um método de classificação mais específico para linhagens de *L. monocytogenes* que a sorotipagem e que REA.

FARBER & ADDISON (1994) testaram 200 iniciadores de 10 bases de comprimento, a fim de determinar a capacidade discriminatória destes frente a uma única linhagem de *L. monocytogenes*. Os iniciadores que apresentaram maior potencialidade foram testados com 52 linhagens de *L. monocytogenes*, compreendendo 11 sorovares, e 12 outras linhagens representando 5 outras espécies de *Listeria*. Os iniciadores que apresentaram melhores resultados foram UBC155 (5'-CTG GCG GCT G-3'), UBC 156 (5'-GCC TGG TTG C-3') e UBC127 (5'-ATC TGG CAG C-3') tendo sido usado como molde o DNA previamente extraído. Com UBC155, 23 perfis foram gerados para as cepas de *L. monocytogenes* testadas, 19 com UBC156 e 26 com UBC127. Quando os resultados obtidos com os 3 iniciadores foram combinados, 34 perfis foram gerados. A análise pelo RAPD permitiu a diferenciação entre as espécies de *Listeria* e também a

sub-divisão das linhagens pertencentes a um mesmo sorovar. Quando considerado o resultado de somente 1 iniciador, linhagens de sorovares diferentes produziram, ocasionalmente, o mesmo perfil de bandas.

2. Objetivos

1- Avaliar a contribuição da matéria prima e fatores ambientais na ocorrência e distribuição de *Listeria monocytogenes* em uma indústria processadora de pescado.

2- Avaliar a diversidade antigênica e genética das cepas de *L. monocytogenes*.

3- Correlacionar a diversidade genética das cepas de *L. monocytogenes* com sua distribuição na indústria.

3. Material e métodos

3.1. Material

3.1.1. Estudo da ocorrência de *Listeria monocytogenes*

Foi analisado um total de 363 amostras, coletadas em diferentes pontos de uma linha de processamento de camarão rosa (*Penaeus brasiliensis*) de uma indústria de processamento de pescado, situada em Santos, SP. A coleta de amostras foi efetuada uma vez ao mes, entre os meses de maio a setembro 1993, tendo sido analisadas matéria prima, água, manipuladores, equipamentos, ambiente e gelo, na seguinte conformidade:

- Camarão - 178 amostras
- Manipuladores - 66 amostras
- Água - 21 amostras
- Gelo - 9 amostras
- Utensílios - 33 amostras
- Ambiente - 56 amostras

A metodologia empregada para a coleta das amostras encontra-se descrita no item 3.2.1.

3.1.1.1. Meios de cultura

- Caldo de enriquecimento para *Listeria*, modificação UVM, Difco (LEB)
- Caldo Fraser, Difco
- Ágar cloreto de lítio-feniletanol moxalactam, Difco (LPM)
- Ágar Palcam, Oxoid (PAL)

- Ágar Oxford modificado, Difco (MOX)
- Ágar soja triptona, adicionado de 0,6% de extrato de levedura, ambos Oxoid (TSA-YE)
- Meio para teste de motilidade, Difco
- Ágar triplice açúcar ferro, Oxoid (TSI)
- Caldo MRVP, Oxoid
- Ágar básico de bromocresol púrpura, Difco (BCP)
- Ágar soja triptona, adicionado de 7% de sangue desfibrinado de cavalo
- Ágar soja triptona, adicionado de 7% de solução de hemáceas de ovelha

3.1.1.2. Soluções

- Solução aquosa de tiosulfato de sódio (Carlo Erba), 10 mg/ml
- Solução aquosa de citrato férrico amoniacal (Fluka), 50 mg/ml
- Solução, em tampão fosfato de potássio, 0,1 M, pH 6,0 de moxalactam (Sigma), 10 mg/ml,
- Suplemento seletivo para ágar Palcam, Oxoid
- Suplemento seletivo para ágar Oxford modificado, Oxoid
- Solução aquosa de dextrose (Difco), 200 mg/ml
- Solução aquosa de manitol (Difco), 200 mg/ml
- Solução aquosa de ramnose (Difco), 100 mg/ml
- Solução aquosa de xilose (Difco), 100 mg/ml
- Solução de α -naftol (Carlo Erba) em etanol absoluto, 50 mg/ml

- Solução aquosa de hidróxido de potássio (Nuclear), 400 mg/ml

3.1.1.3. Outros

- Api-*Listeria*, bioMérieux

3.1.2. Determinação antigênica e do perfil do DNA de *Listeria monocytogenes*

Foram avaliadas 115 cepas isoladas a partir das amostras colhidas, conforme descrito em 3.1.1.

3.1.2.1. Meios de cultura

- Ágar triptose, Difco (TA)
- Caldo soja triptona, adicionado de 0,6 % de extrato de levedura, Difco (TSB-YE)

3.1.2.2. Soluções

- Solução aquosa de cloreto de sódio (Sigma), 9 mg/ml
- Solução 10X de tampão para PCR, Promega
- Solução 25 mM de cloreto de magnésio, Promega
- Solução aquosa de gelatina (Sigma), 0,1 mg/ml
- Solução 2 mM de dNTPs, Pharmacia

- Solução 11,5 μ M de cada um dos iniciadores UBC155 (5'-CTG GCG GCT G-3') e UBC127 (5'-ATC TGG CAG C-3'), University of British Columbia
- Solução de Taq DNA polimerase, Promega, 0,83 U
- Solução 10X de tampão Tris borato EDTA , pH 8,4, Boehringer Mannheim (TBE)
- Solução aquosa de brometo de etídio, Sigma, 10 mg/ml
- Solução corante para PCR
 - 2,5 mg/ml de azul de bromofenol, Sigma
 - 2,5 mg/ml de xileno cianol, Sigma
 - 150 mg/ml de Ficoll 400 (Pharmacia) em água
- Solução tampão Tris-EDTA (TE)
 - 10 mM Tris-HCl, Boehringer Mannheim
 - 1 mM EDTA, Sigma
- Solução ESP
 - 0,25 M EDTA, pH 8,0, Sigma
 - 5 mg/ml N-laurosilsarcosina-Na, Sigma
 - 0,5 mg/ml proteinase K, Boehringer Mannheim
- Solução 1 mM de fluoreto de α -tolueno sulfonila (PMSF), Gibco-BRL, em TE
- Solução tampão de reação para as enzimas Apa I e Sma I, Boehringer Mannheim
- Solução tampão de reação para a enzima Not I, Boehringer Mannheim

3.1.2.3. Equipamentos

- Espectrofotômetro modelo LKB Ultrospec III, Pharmacia

- Aparelho termo-ciclo para amplificação de DNA GeneAmp PCR system 9600, Perkin Elmer

- Cubas para eletroforese horizontal em géis de agarose, Hoefer Scientific

- Fonte LKB GPS 200/400, Pharmacia

- Sistema fotográfico MP4, Polaroid

- Transiluminador UV, Sigma

- Microcentrífuga, Eppendorf

- Sistema para eletroforese em campo pulsante CHEF-DRII, Bio-Rad

- Sistema de refrigeração modelo 1000, Bio-Rad

- Bomba peristáltica, Bio-Rad

3.1.2.4. Outros

- Anti-soro *Listeria* O, tipos 1 e 4, Difco

- Tampão FA, Difco

- Agarose ultra-pura (grau DNA) "high strength", Bio-Rad

- Padrão de peso molecular com 123 pares de base (123 base pair DNA ladder), Gibco-BRL

- Agarose de baixo ponto de fusão, BRL

- Enzimas de restrição Apa I, Sma I e Not I, Boehringer Mannheim

- Padrão de peso molecular para PFGE, Marker I λ ladder, Boehringer Mannheim Biochemica

- Programa DNA Tool Kit, RamSoft

3.2. Métodos

Para melhor compreensão da linha de processamento avaliada, apresenta-se, a seguir, uma descrição da mesma. Na figura 3 tem-se o fluxograma do processamento industrial.

O produto, ao ser desembarcado, era manualmente despejado em tanque com água corrente, a fim de separar os camarões do gelo que os acompanhava. Através de esteira os camarões eram conduzidos para caixas plásticas, onde eram pesados. Durante esta transferência realizava-se a seleção visual dos mesmos, para separação de outros frutos do mar que estivessem misturados a eles. Após a pesagem, as caixas eram transportadas para o interior da usina, sendo seu conteúdo manualmente despejado em um tanque de aço inoxidável. A seguir, com o auxílio de uma mangueira, o tanque era enchido com água e os camarões lavados. Com uma peneira, os camarões eram revolidos, aproximadamente 10 vezes. A água era, então, drenada através de válvula instalada na parte inferior do tanque. Esta água corria livremente pelo piso. Após drenagem, o produto era transferido para caixas plásticas, sendo então levado para as mesas de trabalho. Nas mesas, grupos de operárias faziam a classificação por tamanho, descascavam e evisceravam os camarões. Durante estas etapas, o produto era recolhido em escorredores plásticos, tipo escorredor de macarrão. Em seguida, o produto era lavado com auxílio de mangueira e, novamente, classificado de acordo com o tamanho e qualidade da carne. Os coletados eram os de tamanho grande, com textura firme, que geralmente vão para o mercado externo e têm maior valor comercial. Os camarões eram transferidos para

bandejas de aço inoxidável, colocados lado a lado, e permaneciam à temperatura ambiente até que houvesse sido processada a quantidade necessária de camarões para ser enviada ao congelamento. Após o congelamento, as bandejas eram retiradas do congelador pelo pessoal da área de produtos congelados, e passadas por um chafariz para permitir a remoção dos camarões. Em escorredor plástico, 2,5kg do produto eram pesados e submetidos a uma rápida imersão em água à temperatura aproximada de 10°C para o "glazing". A seguir, eram embalados em sacos de polipropileno. Após a solda da abertura, 12 embalagens eram acondicionadas em caixas de papelão, que eram lacradas e enviadas para comercialização. Quando esta não era imediata, as embalagens de polipropileno eram acondicionadas em caixas plásticas e transferidas para a câmara de estocagem.

Em todas as etapas, os operários usavam luvas, uniformes brancos, aventais plásticos longos, botas e gorros.

3.2.1. Coleta das amostras

3.2.1.1. Camarões

Na figura 3 tem-se o fluxograma do processamento industrial de camarão rosa e os 9 pontos de coleta (P) das amostras de camarões. Coletou-se em cada ponto 5 amostras de aproximadamente 100g cada, sendo cada uma delas tratada como uma amostra independente.

Figura 3- Representação esquemática do processamento industrial de camarão rosa indicando os pontos de coleta das amostras de camarão (P).

3.2.1.2. Manipuladores

As amostras foram obtidas através da lavagem de uma das mãos por aproximadamente 1 min, com 100 ml de solução salina 0,85 %, estéril, contida em sacos plásticos. Os 6 pontos de coleta (M) foram os indicados na figura 4.

O ponto M₁ refere-se às operárias da classificação inicial, M₂ às do descascamento, M₃ às da evisceração, M₄ às da classificação final, M₅ às da pesagem do produto após congelamento e M₆ àquelas da embalagem.

3.2.1.3. Água

Coletou-se assepticamente em 5 pontos, 500 ml de água em frasco estéril, contendo 0,5 ml de solução de tiosulfato de sódio a 1%, a fim de neutralizar o cloro, uma vez que toda a água empregada na empresa é clorada. As amostras foram colhidas com auxílio de concha de aço inoxidável, previamente flambada. Os pontos de coleta (A) estão indicados na figura 4.

A amostra A₁ foi colhida no tanque de lavagem de camarões no exterior da usina, A₂ no tanque de lavagem no interior da usina, A₃ das bandejas de evisceração, A₄ da água de lavagem, após evisceração e A₅ do tanque de "glazing".

Figura 4- Representação esquemática do processamento industrial de camarão rosa, indicando os pontos de coleta das amostras de manipuladores (M) e de água (A).

3.2.1.4. Ambiente e utensílios

Foram 12 os pontos de coleta de amostras ambientais (AB) e 7 os de amostras de utensílios (U). No ponto AB₁ coletou-se amostras do chão da plataforma de desembarque do pescado, no AB₂ da superfície externa da tubulação aérea, próxima a área de lavagem e no AB₄ das superfícies externa e interna de um ralo existente na mesma área. As amostras do ponto AB₃ foram colhidas das superfícies externa e interna do ralo existente próximo a área de classificação; as amostras do ponto AB₅ colhidas da coluna existente na classificação e AB₆, do chão na mesma área. AB₇ e AB₈ representam a área de evisceração, tendo sido o primeiro colhido no chão e o segundo em uma coluna ali existente. As amostras dos pontos AB₉ a AB₁₂ foram colhidas na área de produtos congelados: AB₉ - porta da câmara de estocagem do produto final, AB₁₀ - coluna da área do "glazing", AB₁₁ - chão da área do glazing e AB₁₂ - interior do congelador de placas.

Com relação as amostras de utensílios, as do ponto U₁ foram colhidas das caixas plásticas usadas na área externa; U₂, U₅ e U₇ de escurredores plásticos; U₃ da superfície da mesa de trabalho; U₄ das facas usadas para evisceração e U₆ das superfícies externa e interna das bandejas de congelamento.

Para a amostragem de superfícies planas (mesas, bandejas, caixas, chão, portas e paredes) utilizou-se amostrador de aço inoxidável com área de 25 cm². Cada amostra foi composta de 5 sub-amostras, colhidas com auxílio de esponja estéril umedecida com solução salina 0,85 %, quando necessário, perfazendo um total de 125 cm² de área amostrada por ponto. As 5 sub-amostras foram recolhidas em um saco plástico contendo 100ml de solução salina 0,85 %, estéril.

Para superfícies pequenas e/ou irregulares (escorredores plásticos, facas, ralos) nas quais o amostrador não podia ser empregado, colheram-se amostras com auxílio de zaragatoas estéreis. As zaragatoas foram umedecidas com solução salina 0,85 % sendo a seguir aplicadas sobre toda a superfície (no caso das facas), ou sobre aproximadamente 1/4 da área dos escorredores plásticos (superfícies externa e interna).

A coleta de amostras ambientais irregulares, como interior de drenos e superfície externa de tubos foi feita com aplicação de zaragatoas estéreis em uma área de aproximadamente 25 cm², de acordo com a sensibilidade do amostrador.

Nos últimos 2 casos, cada amostra foi composta de 5 sub-amostras recolhidas em tubo de ensaio contendo 10 ml de solução salina 0,85 % estéril.

Na figura 5 tem-se indicados os pontos de coleta das amostras ambientais e de utensílios.

3.2.1.5. Gelo

Porções de gelo, equivalentes a 500 ml de água, foram colhidas assepticamente em sacos plásticos e a seguir adicionou-se 0,5ml de solução de tiosulfato de sódio a 1 %.

As amostras de gelo foram recolhidas imediatamente após a saída da máquina de produção (G₁), e na hora do desembarque do pescado na plataforma (G₂).

Todas as amostras foram transportadas para o laboratório em caixas isotérmicas contendo gelo, sendo as amostras ambientais, de água, gelo, manipuladores e utensílios examinadas no dia da coleta e as de camarão na manhã seguinte.

Figura 5- Representação esquemática do processamento industrial de camarão rosa indicando os pontos de coleta das amostras ambientais (AB) e de utensílios (U).

3.2.2. Isolamento de *Listeria* spp.

As amostras foram examinadas segundo a metodologia proposta pelo Health Protection Branch do Canadá (WARBURTON et alii., 1991) representada esquematicamente nas figuras 6 e 7.

3.2.2.1. Enriquecimento primário

Para as amostras de camarão, homogeneizou-se 25 g do produto com 25 ml de caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB). Para as amostras de água e gelo transferiu-se uma alíquota de 25 ml para 225 ml de caldo LEB. No caso das amostras de manipuladores, transferiu-se uma alíquota de 25ml da solução salina 0,85 % para 225 ml de caldo LEB. As esponjas utilizadas para a coleta das amostras ambientais e de utensílios (superfícies planas) foram massageadas por aproximadamente 1 min e a seguir 25 ml da solução resultante foram transferidos para 225 ml de caldo LEB. Para as amostras de superfícies pequenas e/ou irregulares, transferiu-se a totalidade da solução salina (10 ml), inclusive as zaragatoas, para 225 ml de caldo LEB.

Os enriquecimentos foram incubados a 30°C/ 24-48h.

3.2.2.2. Enriquecimento secundário e isolamento

Após 24 e 48h de incubação, transferiu-se 0,1 ml do LEB para um tubo contendo 10 ml de caldo Fraser modificado e incubou-se a 35°C/24-26h. Paralelamente, semeou-se uma alçada do caldo LEB em placas de ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM),

ágar Palcam (PAL) e ágar Oxford modificado (MOX). Incubou-se as placas de LPM a 30°C/24-48h e as placas de MOX e PAL a 35°C/24-48h.

Após 24-26h de incubação, os tubos de caldo Fraser modificado apresentando enegrecimento foram semeados em placas de LPM, MOX, PAL que foram incubadas como descrito anteriormente.

3.2.2.3. Seleção e purificação das colônias suspeitas

De placas contendo colônias com as seguintes características: colônias verde azuladas, quando examinadas sob luz transmitida, em ágar LPM; colônias cinza esverdeadas, com centro côncavo e halo negro, em ágar PAL e colônias negras com centro côncavo e halo negro, em ágar MOX, foram selecionadas 3 colônias. Estas foram semeadas em placas de ágar soja triptona com 0,6 % de extrato de levedura (TSA-YE), incubadas a 30°C/24h e examinadas sob luz transmitida. Colônias com coloração verde-azulada foram submetidas à identificação.

3.2.2.4. Identificação das cepas

A identificação das cepas foi feita através dos testes de motilidade em ágar semi-sólido, produção de catalase, fermentação de carboidratos e produção de H₂S em ágar tríplice açúcar ferro (TSI), teste de vermelho de metila e Voges Proskauer, utilização de dextrose, xilose, ramnose e manitol, hemólise em ágar sangue de cavalo e teste Camp. Empregou-se também o API

Listeria, da BioMérieux para a confirmação da identificação das cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas.

Figura 6- Representação esquemática da metodologia para análise de *Listeria* sp. preconizada pelo Health Protection Branch do Canadá (WARBURTON et alii., 1991) para amostras de alimentos e de água. MOX= ágar oxford modificado; PALCAM= ágar palcam; LPM= ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam.

Figura 7- Representação esquemática da metodologia para análise de *Listeria* sp. empregada para amostras ambientais (modificada de WARBURTON et alii., 1991). MOX= ágar oxford modificado; PALCAM= ágar palcam; LPM= ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam.

^a utilizado para superfícies irregulares; ^b utilizado para as demais amostras.

3.2.3. Sorotipagem e fagotipagem das cepas de *L. monocytogenes*

Após o crescimento em TSA-YE, todas as cepas foram submetidas a reação de aglutinação em lâmina para determinação do sorogrupo, empregando-se anti-soro *Listeria* O, tipos 1 e 4, utilizando-se o procedimento rápido em lâmina, recomendado pelo fabricante.

Posteriormente, vinte e cinco cepas representantes destes sorogrupos foram enviadas ao Public Health Laboratory Service, Londres, para serem submetidas a sorotipagem completa e fagotipagem.

3.2.4. Caracterização molecular das cepas de *L. monocytogenes*

3.2.4.1. Ribotipagem

As mesmas 25 cepas selecionadas no item 3.2.3 foram enviadas ao DuPont Central Research and Development, Wilmington, EUA, para ribotipagem empregando-se o sistema RiboPrint™.

3.2.4.2. Análise do polimorfismo do DNA por amplificação aleatória (RAPD)

A linhagem bacteriana foi semeada em placa contendo ágar triptose (TA) e incubada a 30°C por 24h. Uma colônia foi transferida para tubo contendo caldo soja triptona adicionado de 0,6 % de extrato de levedura (TSB-YE) que foi incubado a 37°C/18h com

agitação. Após a centrifugação a 3000 rpm por 15 min., as células foram suspensas em 1 ml de solução salina (NaCl 0,85 %) e transferidas para tubos Eppendorf estéreis. Esta suspensão de células foi centrifugada a 16.250 x g por 5 min, o sobrenadante removido e o precipitado suspenso em 500 μ l de água destilada estéril. As suspensões foram diluídas com água estéril a uma densidade ótica de 1,8 a 600 nm (A_{600}). Esta suspensão contendo aproximadamente 10^7 células/ μ l, foi usada na reação de amplificação.

16,7 μ l de solução de reação contendo 10 mM TrisHCl (pH 9,0); 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 3 mM $MgCl_2$; 0,001% gelatina e 200 μ M de cada dNTP foram tratados por 20 min sob luz ultravioleta de comprimento longo. À seguir, adicionou-se 1 μ M do iniciador (UBC155, 5'-CTG GCG GCT G-3' ou UBC127, 5'-ATC TGG CAG C-3') e 1 μ l das células. Um controle positivo, constituído de DNA cromossômico previamente extraído, e um controle negativo (água destilada estéril, tratada por 20 min sob UV) foram incluídos.

Os tubos Eppendorf foram aquecidos a 96°C por 6 minutos em um aparelho termociclo para amplificação do DNA "DNA Thermocycler GeneAmp PCR System" e, então, os tubos foram removidos, centrifugados por 6 seg a 16.250 x g e 0,83 U de Taq polimerase foram adicionadas em cada um deles. Os tubos foram novamente colocados no banho termocíclico e o seguinte programa executado:

- a- 94°C por 2 min,
- b- 94°C por 1 min,
- c- 35°C por 1 min,
- d- 72°C por 1,5 min,

e- 72°C por 5 min.

As etapas b, c e d foram repetidas por 35 ciclos. Após a última etapa, os tubos foram mantidos a 4°C até a execução da eletroforese.

Imediatamente antes do uso, os tubos foram centrifugados a 16.250 x g por 6 segundos e 1 µl do corante para PCR (SAMBROOK et alii., 1989) foi adicionado.

Os produtos amplificados foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose (1,5 %) em tampão TBE (89 mM Trisbase, pH 8,4; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA) contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio (DILLON et alii., 1985). Um marcador com 123 pares de bases (123 Base Pair Marker) foi incluído como padrão de peso molecular. Os géis foram fotografados sob transiluminação em luz ultravioleta. Os padrões de bandas originados foram visualmente comparados e as cepas agrupadas. Os perfis foram então arbitrariamente numerados e o peso molecular de cada banda estimado com auxílio do programa DNA Tool Kit.

Cada cepa foi testada pelo menos 4 vezes com cada um dos iniciadores, sendo as repetições executadas com células provenientes de cultivos executados em dias diferentes.

3.2.4.3. Análise do polimorfismo do DNA por eletroforese em gel de campo pulsante (PFGE)

A linhagem bacteriana foi semeada em placa de TA e incubada a 30°C por 24h. Uma colônia foi transferida para tubo de TSB-YE que foi incubado a 37°C/18h com agitação. Uma alíquota de

100 μ l foi espalhada superficialmente em TA e a placa incubada a 30°C/18-24h. O crescimento foi recolhido com 1 ml de tampão Tris-EDTA - TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Adicionou-se 200 μ l desta suspensão a 800 μ l de agarose ultra pura, de baixo ponto de fusão (1 % em TE) e, após homogeneização, aplicou-se alíquotas de 100 μ l em moldes plásticos. Após solidificação, os blocos foram removidos dos moldes e incubados a 50°C por 24-48h em solução de lise - ESP (0,25 M EDTA, pH 8,0; 0,5 % sarcosina; 0,5 mg/ml proteinase K) sendo, a seguir, estocados a 4°C. Com auxílio de lamínula de vidro cortou-se 3 ou 4 fatias finas do bloco de agarose tratado com ESP as quais foram transferidas para tubos Eppendorf estéreis, onde foram lavadas por 3 vezes com solução 1 mM de fluoreto de α -tolueno sulfonila (PMSF) em TE. A seguir, a amostra foi lavada por 3 vezes com TE, sendo o intervalo entre as lavagens sempre de 30 minutos.

As fatias de agarose foram então mantidas por 15 min em 100 μ l de solução tampão de reação apropriada à enzima de restrição que foi usada, segundo a indicação do fabricante da mesma. A solução tampão foi retirada e nova alíquota de 100 μ l adicionada, assim como 50 U da enzima (Apa I, Sma I ou Not I). Os tubos foram incubados por 18 horas a 30°C para Apa I, 25°C para Sma I e 37°C para Not I.

Os fragmentos de restrição de alto peso molecular, gerados pela digestão, foram resolvidos em gel de agarose (1%) em tampão TBE (45 mM Tris, pH 8,4; 45 mM ácido bórico; 1 mM EDTA) usando o "CHEF-DRII Pulsed-field Electrophoresis System" durante 21h e 200v. A temperatura do TBE foi mantida constante a 12°C através de recirculação pelo Sistema de Refrigeração Modelo 1000. Os tempos

inicial e final de pulso ("pulse-times") foram 5s e 40s; 1,5s e 18s; 5s e 50s para Apa I, Sma I e Not I, respectivamente.

O gel foi, então, corado por 1 hora em solução aquosa de brometo de etídio, 1µg/ml (DILLON et alii., 1985), e descorado por 3h em água, sendo a seguir fotografado sob transiluminação com luz ultravioleta. Como padrão para peso molecular utilizou-se o Marker I, λ ladder.

O perfil das bandas foi determinado conforme descrito no item 3.2.4.2 para RAPD.

Cada amostra foi testada pelo menos 4 vezes, com cada uma das enzimas empregadas.

4. Resultados e discussão

4.1. Estudo da ocorrência de *Listeria monocytogenes*.

No decorrer do trabalho, foi analisado um total de 363 amostras, sendo 178 provenientes de camarão, 66 de manipuladores, 21 de água, 9 de gelo, 33 de utensílios e 56 de ambiente. Deste total, 64 amostras (17,6%) apresentaram-se contaminadas por *L. monocytogenes* (Tabela 2).

As amostras ambientais, de utensílios e de água apresentaram maior positividade para *L. monocytogenes* que as demais (25%, 24,2% e 23,8% respectivamente). As amostras de camarão apresentaram 18,0% de contaminação e as de manipuladores 7,6%. Nenhuma das amostras de gelo mostrou-se positiva para *L. monocytogenes* (Tabela 2).

De maneira geral, a percentagem de amostras positivas para *L. monocytogenes* encontradas nesta pesquisa, foi superior àquelas relatadas por outros pesquisadores para amostras colhidas em usinas processadoras de alimentos (GABIS et alii., 1989; COX et alii., 1989; GENIGEORGIS et alii., 1989; CHARLTON et alii., 1990; GENIGEORGIS et alii., 1990; WENGER et alii., 1990; WALKER et alii., 1991; KLAUSNER & DONNELLY, 1991; FUCHS & REILLY, 1992; VAN DEN ELZEN & SNIJDERS, 1993; JEMMI & KEUSCH, 1994). Destes estudos, apenas os realizados por FUCHS & REILLY (1992) e JEMMI & KEUSCH (1994) estavam relacionados a pescados.

Resultados semelhantes aos desta pesquisa foram obtidos por LAWRENCE & GILMOUR (1994) em uma indústria processadora de aves na Irlanda do Norte.

Tabela 2 - Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em diferentes tipos de amostras coletadas em uma indústria processadora de pescados, localizada em Santos, SP.

Tipo de amostra	n° de amostras examinadas	n° (%) de amostras positivas para <i>L. monocytogenes</i>
Camarão	178	32 (18,0)
Manipulador	66	5 (7,6)
Gelo	9	0 (-)
Água	21	5 (23,8)
Utensílios	33	8 (24,2)
Ambiente	56	14 (25)
Total	363	64 (17,6)

A Tabela 3 mostra a freqüência de isolamento de *L. monocytogenes* a partir de amostras colhidas das mãos de trabalhadores desta linha de processamento. Observa-se que *L. monocytogenes* não foi isolada das amostras obtidas dos manipuladores que faziam o descascamento (M₂), a evisceração (M₃) e a classificação após a evisceração (M₄). Observa-se, também, que as amostras obtidas na classificação inicial (M₁) e na pesagem pós - congelamento (M₅) apresentaram percentagens de contaminação muito próximas (6,7% e 7,7%, respectivamente). As amostras, colhidas das mãos dos operários que trabalhavam na embalagem (M₆) do produto final, foram as que apresentaram maior positividade para *L. monocytogenes* (37,5%).

As variações no número de amostras de manipuladores examinadas são decorrentes de alterações feitas pela empresa, no número de operários executando cada uma destas tarefas. Assim, de acordo com a demanda, a empresa remanejava funcionários para outras linhas de processamento. Quando os mesmos manipuladores executavam duas ou mais tarefas, as amostras colhidas foram consideradas em cada uma das operações, como sendo provenientes de manipuladores diferentes.

Tabela 3 - Frequência de isolamento de *L. monocytogenes* a partir de mãos de trabalhadores de uma linha de processamento industrial de camarão rosa (*Penaeus brasiliensis*).

Ponto amostrado	nº de amostras examinadas	nº de amostras (%) positivas para <i>L. monocytogenes</i>
Classificação inicial (M ₁)	15	1 (6,7)
Descascamento (M ₂)	13	0 (-)
Evisceração (M ₃)	13	0 (-)
Classificação pós-evisceração (M ₄)	4	0 (-)
Pesagem (M ₅)	13	1 (7,7)
Embalagem (M ₆)	8	3 (37,5)
Total	66	5 (7,6)

A percentagem de amostras de mãos de trabalhadores, positivas para *L. monocytogenes* nesta linha de processamento, é coincidente com a obtida por KERR et alii. (1993) que verificaram a presença desta bactéria em 7% das mãos de indivíduos diretamente envolvidos na manipulação de alimentos. VAN DEN ELZEN & SNIJDERS (1993) encontraram 8,6% de amostras positivas para *L. monocytogenes* dentre as 70 amostras de mãos de trabalhadores de abatedouros de suínos e de bovinos, valor este próximo ao encontrado neste trabalho.

Já para GENIGEORGIS et alii. (1989) a percentagem de amostras de mãos, positivas para *L. monocytogenes* foi superior. Eles encontraram *L. monocytogenes* nas mãos e nas luvas de 28 (34,7%) dos 75 trabalhadores de um abatedouro de frangos. Numa avaliação feita num abatedouro de perus, GENIGEORGIS et alii. (1990) encontraram 11 (12,2%) amostras positivas para *L. monocytogenes* dentre as 90 colhidas de mãos e luvas.

A diferença entre as percentagens de amostras positivas encontradas por GENIGEORGIS et alii. (1989 e 1990) e as apresentadas neste trabalho pode ser devida a amostragem. Nesta pesquisa, solicitou-se aos trabalhadores que retirassem as luvas para que as amostras fossem colhidas das mãos, enquanto naqueles trabalhos, os pesquisadores não especificaram quantas amostras foram colhidas das mãos ou das luvas.

JEMMI & KEUSCH (1994) também encontraram maior percentagem de amostras positivas. De um total de 66 amostras provenientes das mãos de operários de 3 empresas de defumação de trutas, 14 (21,2%) amostras foram positivas para *L.*

monocytogenes. É interessante ressaltar que todas as amostras positivas eram provenientes de uma única empresa com condições higiênico-sanitárias deficientes.

A disseminação de doenças veiculadas por alimentos através das mãos já está amplamente documentada. Sabe-se também da importância que as mãos dos manipuladores de alimentos têm na contaminação cruzada. Assim, a presença de indivíduos portadores de *L. monocytogenes* nas etapas que envolvem a manipulação de produtos já congelados (M₅ e M₆) pode levar a contaminação do produto final.

Como foi visto na Tabela 2, das 33 amostras de utensílios examinadas, 8 (24,2%) estavam contaminadas por *L. monocytogenes*. As amostras das caixas plásticas usadas no recebimento do produto (U₁), dos escorredores que acondicionam os camarões após a classificação inicial (U₂) e das bandejas do congelador de placas (U₆) apresentaram maior índice de contaminação (40%) que as demais amostras (Tabela 4). O escorredor utilizado para colocar os camarões na classificação final (U₅) apresentou 25% das amostras contaminadas. Das amostras da mesa de trabalho (U₃), 20% foram positivas para *L. monocytogenes* (Tabela 4). *L. monocytogenes* não foi isolada das facas usadas para evisceração (U₄) nem do cesto de pesagem do produto já congelado (U₇).

Tabela 4 - Frequência de isolamento de *L. monocytogenes* a partir de utensílios utilizados em uma linha de processamento industrial de camarão rosa (*Penaeus brasiliensis*).

Ponto amostrado	n° de amostras examinadas*	n° de amostras (%) positivas para <i>L. monocytogenes</i>
Caixa plástica (U ₁)	5	2 (40)
Escorredor - classificação inicial (U ₂)	5	2 (40)
Mesa (U ₃)	5	1 (20)
Faca (U ₄)	5	0 (-)
Escorredor - classificação final (U ₅)	4	1 (25)
Bandeja do congelador (U ₆)	5	2 (40)
Cesto de pesagem (U ₇)	4	0 (-)
Total	33	8 (24,2)

* cada amostra foi composta por 5 sub-amostras combinadas, e tratadas como única por ponto.

O valor total apresentado na Tabela 4 (24,2%) é superior àqueles encontrados por outros pesquisadores. VAN DEN ELZEN & SNIJDERS (1993) examinaram 141 amostras de facas, caixas para acondicionamento de cortes de carne, mesas e outras superfícies de contato com a carne de suínos e bovinos e verificaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em 7 (4,7%) amostras. JEMMI & KEUSCH (1994) obtiveram 13 (11,1%) amostras positivas para *L.*

monocytogenes dentre as 117 amostras de utensílios usados para o abate e defumação de trutas.

A existência de utensílios contaminados por *L. monocytogenes* é uma indicação de limpeza e sanificação ineficiente dos mesmos. Estes utensílios podem ser responsáveis pela contaminação dos produtos, bem como pela perpetuação de *L. monocytogenes* na usina.

Com relação às amostras de água, verificou-se que 23,8% foram positivas para *L. monocytogenes* (Tabela 2), enquanto que não se isolou a espécie das amostras de gelo. Não foram coletadas amostras de água diretamente na saída dos reservatórios, mas sabe-se que toda a água empregada na empresa era clorada a níveis adequados.

As amostras de água do tanque de lavagem do camarão no interior da unidade processadora (A₂) e as de água do "glazing" (A₅) apresentaram índice de contaminação por *L. monocytogenes* de 40% (Tabela 5). Das amostras de água do tanque externo de lavagem do camarão (A₁) 20% foram positivas para *L. monocytogenes*. O microrganismo não foi isolado das demais amostras [água das bandejas de evisceração (A₃) e da água de lavagem do camarão após evisceração (A₄)].

Apesar do número relativamente pequeno de amostras de água examinadas, as percentagens de amostras positivas encontradas neste trabalho foram superiores às relatadas em outras pesquisas. GENIGEORGIS et alii. (1989) examinaram 80 amostras de

água colhidas em diversas etapas do abate de frangos e isolaram *L. monocytogenes* de 3 (3,8%) delas. Na pesquisa realizada em abatedouro de perus, GENIGEORGIS et alii. (1990) isolaram *L. monocytogenes* de 3 (5%) das 60 amostras de água colhidas nas diversas etapas do abate.

Tabela 5 - Ocorrência de *L. monocytogenes* em amostras de água colhidas em diferentes pontos de uma linha de processamento industrial de camarão rosa (*Penaeus brasiliensis*).

Ponto amostrado	Nº de amostras examinadas	Nº de amostras positivas (%) para <i>L. monocytogenes</i>
Lavagem do camarão após o desembarque (A ₁)	5	1 (20)
Tanque de lavagem no interior da usina (A ₂)	5	2 (40)
Bandeja de evisceração (A ₃)	4	0 (-)
Lavagem após evisceração (A ₄)	2	0 (-)
Tanque de "glazing" (A ₅)	5	2 (40)
Total	21	5 (23,8)

A diferença entre a percentagem de amostras positivas encontradas por GENIGEORGIS et alii. nos dois trabalhos citados e a encontrada nesta pesquisa pode estar relacionada à não neutralização do cloro por aqueles pesquisadores, antes da adição

da amostra ao meio de cultura. Eles mencionaram que toda a água empregada era potável e que tanto a água do "chiller" como a da lavagem final continha 20-25 ppm de cloro. Além disso a amostragem em questão foi feita em indústrias processadoras de aves e não frutos do mar.

Mesquita (1991) examinando 30 amostras de água residuária de lavagem de carcaça bovina provenientes de um matadouro frigorífico da cidade de Goiânia, GO, encontrou *Listeria* em apenas 1 delas.

Das amostras ambientais, 25% apresentaram-se contaminadas por *L. monocytogenes* (Tabela 2), com a percentagem de positividade variando entre 0 e 50 % (Figura 8).

As amostras com maior percentagem de positividade (50%) foram as colhidas na porta da câmara de estocagem do produto final (AB₉) e no interior do congelador de placas (AB₁₂). A seguir, tem-se as amostras provenientes do chão da plataforma de desembarque do pescado (AB₁), dos ralos das áreas de classificação (AB₃) e lavagem de camarões no interior da planta (AB₄), e do chão da área do "glazing" (AB₁₁), todos com 40% de positividade para *L. monocytogenes*. As amostras do chão da classificação (AB₆) e da coluna existente na área do "glazing" (AB₁₀) foram positivas em 20% das vezes que foram testadas.

Não foi possível isolar *L. monocytogenes* das amostras da superfície externa da tubulação aérea, próxima à área de lavagem interna (AB₂) e da coluna existente na classificação (AB₅), e das

amostras colhidas do chão (AB7) e na coluna (AB8), ambas da área de evisceração.

* número de amostras coletadas por ponto. Cada amostra foi composta por 5 sub-amostras combinadas, e tratadas como única por ponto

Figura 8 - Frequência de isolamento de *L. monocytogenes* em amostras ambientais, coletadas em diferentes pontos de uma usina processadora de pescados localizada em Santos, SP. A localização dos pontos amostrados está apresentada na figura 5.

A ocorrência de *L. monocytogenes* nas amostras ambientais desta usina processadora de pescados foi, de maneira geral, superior à relatada por outros pesquisadores para o mesmo tipo de amostra (COX et alii., 1989; GABIS et alii., 1989; CHARLTON et alii., 1990; WENGER et alii., 1990; KLAUSNER & DONNELLY, 1991; WALKER et alii., 1991; LAWRENCE & GILMOUR, 1994), tendo sido, porém, igual àquela encontrada por JEMMI & KEUSCH (1994). Estes pesquisadores examinaram 16 amostras de drenos e de piso de 3 unidades

defumadoras de trutas, na Suíça, e encontraram *L. monocytogenes* em 4 (25%) delas.

Somente VAN DEN ELZEN & SNIJDERS (1993) encontraram valores superiores aos desta pesquisa. Dentre as 55 amostras ambientais, colhidas em abatedouros de suínos e bovinos, examinadas, 28 (51%) foram positivas para *L. monocytogenes*, sendo a maioria proveniente de esteiras e de chão/parede.

O não isolamento de *L. monocytogenes* das amostras colhidas da superfície externa da tubulação aérea próxima a área de lavagem (AB₂), bem como das colunas existentes na classificação (AB₅) e na área de evisceração (AB₈) coincide com o que foi observado por COX et alii. (1989) e KLAUSNER & DONNELLY (1991). Estes pesquisadores verificaram que as áreas "secas" das usinas são menos suscetíveis à contaminação por *Listeria* spp. do que as áreas "molhadas". Já o não isolamento de *L. monocytogenes*, a partir das amostras do chão (AB₇) da área de evisceração, não era esperado por ser esta uma área constantemente úmida e com resíduos de alimentos.

A coluna da área do "glazing" (AB₁₀) estava constantemente úmida, pois a área de manipulação de produto congelado era mantida a aproximadamente 15°C, através de sistema de refrigeração aéreo, o que fazia com que gotículas de água pingassem constantemente molhando-a.

Os ralos (AB₃ e AB₄) e o chão (AB₁, AB₆ e AB₁₁), como esperado, apresentaram elevada percentagem de positividade

para *L. monocytogenes*, o que está de acordo com outros pesquisadores (MEAT, 1987; COX et alii., 1989; CHARLTON et alii., 1990; KLAUSNER & DONNELLY, 1991; WALKER et alii., 1991; LAWRENCE & GILMOUR, 1994).

A contaminação da porta da câmara de estocagem do produto final (AB₉) e do congelador de placas (AB₁₂) pode ser causada pela higienização inadequada destas superfícies quando da limpeza geral da fábrica.

Com relação à limpeza e sanificação, esta empresa era limpa e sanificada 3 vezes por semana, em dias alternados e como agente sanificante empregavam-se produtos clorados. As paredes eram revestidas com material vidro-cerâmico, de maneira geral em bom estado de conservação. O piso era de cerâmica, sendo a distribuição e o número dos ralos inadequada, o que possibilitava o acúmulo excessivo de água no piso.

Comparando-se os resultados obtidos nesta pesquisa para as amostras de camarão (Tabela 2), com aqueles obtidos por outros pesquisadores, verifica-se que a frequência de isolamento de *L. monocytogenes* neste trabalho foi novamente superior (ARCHER, 1988; WEAGANT et alii., 1988; HOEFER & RIBEIRO, 1990; HARTEMINK & GEORGSSON, 1991; MOTES, 1991; MASUDA et alii., 1992; RAVOMANANA et alii., 1993; GECAN et alii., 1994). Apenas RORVIK & YNDESTAD (1991) obtiveram frequências de isolamento semelhantes, tendo obtido 3 (19%) amostras positivas para *L. monocytogenes* dentre as 16 amostras de camarões crus, descascados e em salmoura examinadas.

Alguns pesquisadores como BUCHANAN et alii. (1989), FUCHS & SURENDRAN (1989) e KAMAT & NAIR (1994) não isolaram *L. monocytogenes* a partir das amostras de camarão examinadas.

É interessante notar que a prevalência de *L. monocytogenes* em frutos do mar examinados em outros países tropicais como a Índia (FUCHS & SURENDRAN, 1989 e KAMAT & NAIR, 1994) e Trinidad - West Indies (ADESIYUM, 1993) foi baixa, variando de 0 a 2 %. Pode-se supor que esta variação seja devida a diferenças entre a metodologia analítica empregada pelos diferentes pesquisadores, além de variações na microbiota da água e dos sedimentos da região onde a pesca foi realizada, bem como cuidados higiênico-sanitários no manuseio pós-pesca.

Vale ainda mencionar que, dentre as amostras de camarão estudadas, além das 32 positivas para *L. monocytogenes*, observou-se 30 (16,9%) contaminadas por *Listeria innocua*, 40 (22,5%) com *Listeria seeligeri*, 11 (6,2%) com *Listeria ivanovii* e 3 (1,7%) com *Listeria welshimeri* (Tabela 6). Deve-se ressaltar que 24 (13,5%) amostras apresentaram contaminação por mais de uma espécie.

Tabela 6 - Prevalência das espécies de *Listeria* isoladas de 178 amostras de camarão rosa (*Penaeus brasiliensis*), coletadas em uma indústria processadora de pescados, localizada em Santos. SP.

Espécie	n° (%) de amostras
	positivas
<i>L. monocytogenes</i>	32 (18,0)
<i>L. innocua</i>	30 (16,9)
<i>L. seeligeri</i>	40 (22,5)
<i>L. ivanovii</i>	11 (6,2)
<i>L. welshimeri</i>	3 (1,7)

Analizando-se a frequência de isolamento de *L. monocytogenes* em camarões coletados nos diferentes pontos amostrados, verifica-se um aumento na percentagem de amostras positivas para a espécie no decorrer das etapas de processamento (Figura 9).

Ao chegar à indústria (P₁ e P₂), a matéria prima apresentava baixa percentagem de amostras positivas para *L. monocytogenes* (5,3% e 4,2 %, respectivamente). Após a lavagem dos camarões já dentro da usina de processamento (P₃), nota-se uma elevação da percentagem de amostras positivas (8,0%). No ponto P₄, após a classificação inicial, a positividade é de 32 %, valor esse que se mantém na faixa entre 35 e 30 % até a lavagem, após a

evisceração (P7). *L. monocytogenes* foi isolada de 16% das amostras do produto final (P8), armazenado a -25°C.

A priori, pode-se supor que este aumento no número de amostras positivas no decorrer do processamento seja devido à exposição da cauda dos camarões a listérias do seu próprio trato digestivo, das mãos e luvas dos manipuladores e de todas as outras superfícies de contato como escorredores, mesas, bandejas, etc. Outra hipótese para explicar o aumento do número de amostras positivas para *L. monocytogenes* é a elevação da temperatura dos camarões durante o processamento, o que permitiria a multiplicação das bactérias já existentes e sua maior disseminação no ambiente.

Figura 9 - Frequência de isolamento de *L. monocytogenes* em amostras de camarão rosa (*Penaeus brasiliensis*) coletadas em diferentes pontos de uma linha de processamento industrial. A localização dos pontos amostrados está indicada na Figura 3.

A Figura 10 apresenta a percentagem de amostras positivas para *L. monocytogenes* nos diferentes meses de coleta. Verifica-se que no mes de maio de 1993, início da industrialização do camarão rosa para exportação naquela indústria, 6 (8,6%) das 70 amostras colhidas foram positivas para *L. monocytogenes*, sendo que no mês de julho ocorreu uma queda destes valores, com 4 (5,3%) das 75 amostras positivas. A partir de julho ocorreu elevação na percentagem de amostras positivas, atingindo um máximo de 27,3% no mês de setembro, último mês da coleta de amostras.

Figura 10 - Ocorrência de *L. monocytogenes* nas diferentes amostras examinadas, durante o período de maio a setembro de 1993, em uma usina processadora de pescados, localizada em Santos, SP.

A figura 10 apresenta ainda as percentagens de amostras positivas para *L. monocytogenes* para cada um dos grupos de amostras examinados, nos diferentes meses de coleta.

A elevação no número de amostras positivas para *L. monocytogenes* no decorrer dos meses pode ser devida à colonização da usina por linhagens do microrganismo que se adaptaram ao ambiente ou encontraram nichos adequados para sua sobrevivência e multiplicação.

4.2. Sorotipagem e fagotipagem das cepas de *L. monocytogenes*

Do total de 480 cepas de *L. monocytogenes* isoladas, selecionou-se 115 para serem submetidas à sorotipagem, e tipagem molecular do DNA. A escolha das cepas foi feita de maneira a ter-se preferivelmente 2 cepas representando cada uma das amostras positivas para *L. monocytogenes*. A Tabela 7 apresenta a identificação destas 115 cepas de *L. monocytogenes*.

Com a sorotipagem inicial verificou-se que 13 (11,3%) cepas pertenciam ao sorogrupo 4 e as 102 (88,7%) restantes ao sorogrupo 1 (Tabela 7). O predomínio de cepas pertencentes ao sorogrupo 1 está de acordo com os dados obtidos por WENGER et alii. (1990) e por JEMMI & KEUSCH (1994). Os dois grupos de pesquisadores observaram o predomínio de cepas do sorogrupo 1 (sorovares 1/2a, 1/2b e 1/2c) em cepas isoladas a partir de amostras colhidas

em uma usina processadora de salsichas de peru e em indústrias de abate e processamento de trutas, respectivamente. Os resultados também concordam com os obtidos, para frutos do mar, por WEAGANT et alii. (1988), WONG et alii. (1990), de SIMÓN et alii. (1992) e por HOFFER & RIBEIRO (1990) que encontraram dentre as 4 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de camarão, 3 pertencentes ao sorovar 1/2a e 1 ao sorovar 4b.

COLBURN et alii. (1990) também isolaram maior percentagem de *L. monocytogenes* pertencente ao sorogrupo 1, de amostras de água e sedimentos estuarinos.

Dentre as 115 cepas selecionou-se um grupo de 25, compreendendo 11 cepas pertencentes ao sorogrupo 4 e 14 ao sorogrupo 1, o qual foi enviado ao Central Public Health Laboratory, em Londres, para sorotipagem completa e fagotipagem.

A Tabela 8 apresenta os resultados da sorotipagem e fagotipagem destas 25 cepas. As 11 cepas do sorogrupo 4 pertenciam ao sorovar 4b, enquanto 7 cepas do sorogrupo 1 pertenciam ao sorovar 1/2b, 2 ao 1/2c e as 5 restantes ao sorovar 1/2a. Os sorovares 1/2a, 1/2b e 4b são os responsáveis pela maioria dos casos de listeriose humana (FARBER & PETERKIN, 1991).

Para a fagotipagem empregou-se, além do conjunto de fagos internacionais, 6 outros fagos experimentais: 351, 881, 717 e 586 para as cepas do sorogrupo 1/2 e 110 e 2425A para as cepas do sorogrupo 4.

Tabela 7 - Identificação e origem das cepas de *L. monocytogenes* utilizadas para sorotipagem e tipagem molecular.

Cepa	Procedência
<u>1</u> , <u>2</u> , <u>3</u> , <u>4</u> ^a	Chão, plataforma de desembarque do pescado (AB ₁ ^b)
5, 6, 7, 8	Ralo, área de classificação (AB ₃)
9, 10, 11, 12	Ralo, área de lavagem (AB ₄)
13, 14	Chão, área de classificação (AB ₆)
15, 16, 17	Porta da câmara de estocagem do produto final (AB ₉)
18	Coluna, área do "glazing" (AB ₁₀)
19, 20, 21, 22	Chão, área do "glazing" (AB ₁₁)
23, 24, 25 ^c	Interior do congelador de placas (AB ₁₂)
27, 28	Água do tanque de lavagem de camarões, plataforma de desembarque (A ₁)
29, 30, 31	Água do tanque de lavagem, área de lavagem (A ₂)
32, 33, 34, 35	Água do tanque de "glazing" (A ₅)
36, 37, 38, 39	Caixas plásticas da área de recepção (U ₁)
40, 41, 42, 43	Escondedores plásticos, classificação inicial (U ₂)
44	Mesa de trabalho (U ₃)
45, 46	Escondedor plástico, classificação final (U ₅)
47, 48, 49, 50	Bandejas de congelamento (U ₆)
51, 52	Manipulador, classificação inicial (M ₁)
53	Manipulador, "glazing" (M ₅)
54, 55, 56, 57	Manipulador, embalagem (M ₆)
58	Camarão, plataforma de desembarque (P ₁)
59, 60	Camarão, após lavagem na plataforma de desembarque (P ₂)
61, 62, 63, 64	Camarão após lavagem, área de lavagem (P ₃)
<u>65</u> , <u>66</u> , 67, 68, <u>69</u> , <u>70</u> , <u>71</u> , <u>72</u> , <u>73</u> , <u>74</u> , <u>75</u> , 76, 77, 80, 81	Camarão, após classificação inicial (P ₄)
82 a 91	Camarão, após descascamento (P ₅)
92 a 100	Camarão, após evisceração (P ₆)
101 a 111	Camarão, antes da classificação final (P ₇)
78, 79, 112 a 116	Camarão, após embalagem (P ₈)

^a números sublinhados indicam cepas do sorovar 4b

^b indica localização das amostras, de acordo com as figuras 3, 4 e 5

^c número 26 foi omitido quando da numeração das cepas

Tabela 8 - Sorovares e fagovares de 25 cepas de *L. monocytogenes* isoladas a partir de amostras de diversas fontes, colhidas em uma usina processadora de pescados, localizada em Santos, SP.

Grupo	Cepa ^a	Sorovar	Fagovar
I	1,2	4b	2671, 2425, +
II	3,4,65,69,70,72, 73,74,75	4b	NT ^b
III	16	1/2b	43, +
	33	1/2b	43, 351, +
	39	1/2b	43, 19, 4477, +
	40	1/2b	43, 4477, 12029, +
	52	1/2b	43, +
	54	1/2b	43, +
	100	1/2b	43, 575, +
IV	29	1/2c	4477
	64	1/2c	4477
V	46	1/2a	10, 43, 46, 21, 19, 387, 2685, 12029, 351, 717, 586
	68	1/2a	10, 43, 46, 21, 387, 2685, 12029, 351, 717, 586
VI	27	1/2a	43, 4477
VII	59 e 61	1/2a	NT

^a veja Tabela 7 para a identificação das cepas

^b não tipável

Onze (44%) das 25 cepas não foram fagotipáveis, sendo 9 cepas pertencentes ao sorovar 4b e 2 ao sorovar 1/2a (Tabelas 8 e

9). Segundo AUDURIER & MARTIN (1989) a freqüência de linhagens não tipáveis está entre 22 e 48 %, em diversos estudos realizados. ESTELA et alii. (1992) fagotiparam 227 cepas de *L. monocytogenes* isoladas a partir de frutos do mar e encontraram 54 (24%) não tipáveis. PEREIRA et alii. (1994) tiparam 21 cepas de *L. monocytogenes* isoladas no Brasil e encontraram 48% de cepas não tipáveis.

Tabela 9 - Total de cepas de *L. monocytogenes* fagotipáveis e não fagotipáveis, dentre as 25 isoladas a partir de amostras de diversas fontes, colhidas em uma indústria processadora de pescados, localizada em Santos, SP.

Característica	Sorogrupo		Total
	1/2	4	
Fagotipáveis	12 (85,7%)	2 (18,2%)	14 (56,0%)
Não fagotipáveis	2 (14,3%)	9 (81,8%)	11 (44,0%)
Total	14	11	25

A elevada percentagem de linhagens pertencentes ao sorogrupo 4, não fagotipáveis, encontrada nesta pesquisa (81,8%) (Tabela 9) está em desacordo com os resultados observados por outros pesquisadores (McLAUHLIN et alii., 1986; AUDURIER & MARTIN, 1989) que encontraram maior percentagem de cepas fagotipáveis dentre as do sorogrupo 4. Por outro lado, PEREIRA et alii. (1994) também encontraram maior percentagem de cepas não fagotipáveis entre as pertencentes ao sorogrupo 4 (54,4%) que entre

as pertencentes ao sorogrupo 1/2 (40%). Para ESTELA et alii. (1992) estas percentagens foram bem próximas, sendo 25 e 21 % das cepas não tipáveis pertencentes aos sorogrupos 1/2 e 4, respectivamente.

Os fagovares encontrados nesta pesquisa não puderam ser relacionados aos encontrados por ESTELA et alii. (1992) nem aos encontrados por PEREIRA et alii. (1994), que também empregaram o conjunto internacional de fagos. Para os primeiros, os fagovares 575 e 1967 foram os mais frequentemente encontrados para as cepas do sorogrupo 1/2 e o fagovar 1317 para as do sorovar 4b. Já o segundo grupo de pesquisadores encontrou mais frequentemente o fagovar 2685 para as cepas do sorogrupo 1/2, não tendo havido predomínio de fagovar para as cepas do sorogrupo 4.

De acordo com os fagovares encontrados nesta pesquisa, pode-se dividir as 25 cepas de *L. monocytogenes* em 7 grupos, conforme indicado na Tabela 8. Confirmou-se assim o maior poder discriminatório da fagotipagem, que permitiu a distinção entre linhagens pertencentes a um mesmo sorovar. Esta distinção pode ser notada nos grupos I e II, ambos sorovar 4b, e grupos V, VI e VII todos sorovar 1/2a.

Apesar de seu poder discriminatório, a fagotipagem de cepas de *L. monocytogenes* ainda precisa ser aprimorada, sendo necessário o isolamento de novos fagos, a fim de diminuir o número de linhagens não tipáveis.

4.3. Caracterização molecular das cepas de *L. monocytogenes*

4.3.1. Ribotipagem pelo sistema RiboPrint™

As mesmas cepas relacionadas na Tabela 8 foram enviadas ao DuPont Central and Development, em Delaware, EUA, para ribotipagem com o sistema RiboPrint. Conforme pode ser verificado na Tabela 10, 6 RiboGroups™ foram identificados, sendo o maior número de cepas pertencente ao RiboGroup dd0653 (7 cepas), seguido dos RiboGroups dd6323 (6 cepas) e dd0566 (5 cepas).

Tabela 10 - RiboGroups™, gerados pelo sistema RiboPrint™ da DuPont, de 25 cepas de *L. monocytogenes* isoladas a partir de amostras de diversas fontes, colhidas em uma indústria processadora de pescados, localizada em Santos, SP.

Cepas ^a	RiboGroup	Padrão de restrição com EcoRI

1 e 2	dd0647
3, 4, 40, 65, 69, 70 e 72	dd0653
16, 33, 39, 52, 54 e 100	dd6323
27 e 59	dd1966
29, 46, 61, 64 e 68	dd0566
73, 74 e 75	dd7745

^a veja Tabela 7 para identificação das cepas

A cepa número 40, pertencente ao sorovar 1/2b, apresentou perfil semelhante ao das cepas 3, 4, 65, 69, 70 e 72, todas pertencentes ao sorovar 4b.

Linhagens pertencentes a um mesmo RiboGroup não são necessariamente pertencentes a um mesmo clone, elas apenas não podem ser diferenciadas uma das outras pelos perfis gerados pela digestão com Eco RI. Assim, linhagens de diferentes origens podem pertencer a um mesmo RiboGroup (S. J. FRITSCHER, comunicação pessoal).

O RiboGroup dd0647, ao qual pertencem as cepas 1 e 2, agrupa a maioria das cepas de *L. monocytogenes* associadas aos mais importantes surtos de listeriose, como o surto canadense causado por salada de repolho tipo "coleslaw" em 1983, o surto causado por queijo Jalisco em Los Angeles em 1985, e o surto causado por queijos Vacherin em Vaud, na Suíça em 1987 (S. J. FRITSCHER, comunicação pessoal).

Comparando-se a composição dos 7 grupos gerados pela fagotipagem, com os 6 RiboGroups, nota-se similaridade entre as cepas estudadas. As cepas 1 e 2; 3, 4, 65, 69, 70 e 72; 16, 33, 39, 52, 54 e 100; 29 e 64; 46 e 68; 73, 74 e 75 pertenciam a um mesmo fagovar e ribovar, o que indica serem estas cepas epidemiologicamente relacionadas. As demais cepas (27, 59, 40 e 61) foram alocadas em grupos diferentes em cada uma das tipagens, não sendo possível correlacioná-las.

4.3.2. RAPD

As 115 cepas de *L. monocytogenes* relacionadas na Tabela 7 foram submetidas a análise do polimorfismo do DNA por amplificação aleatória (RAPD) com 2 iniciadores de sequência aleatória (UBC 155 e UBC 127).

O emprego de célula bacteriana íntegra, como molde para amplificação, originou padrões de bandas altamente reprodutíveis. O emprego de um controle positivo contendo DNA de *L. monocytogenes* previamente extraído ratificou a eficácia da técnica, enquanto que produtos de amplificação não foram detectados a partir dos tubos contendo água destilada.

Empregando-se o iniciador UBC155 identificou-se 11 perfis diferentes de DNA, com 7 a 17 bandas distintas. Os pesos moleculares das bandas variaram entre 246 bp e 1845 bp, sendo que as bandas de 705 bp e 861 bp estavam presentes nos 11 perfis (Tabela 11, Figura 11).

Para este mesmo iniciador constatou-se que aos perfis 3, 6, e 8 pertenciam, respectivamente 32, 14 e 49 cepas. As demais cepas estavam distribuídas entre os diferentes perfis (Tabela 12).

Das 13 cepas de *L. monocytogenes* pertencentes ao sorogrupo 4, 2 pertenciam ao perfil 1 (cepas 1 e 2), 2 ao perfil 2 (cepas 3 e 4), 6 ao perfil 3 (cepas 65, 66 e 69 a 72) e 3 ao perfil 11 (cepas 73, 74 e 75) (Tabela 12).

Com o iniciador UBC127 identificou-se 16 perfis de DNA com 8 a 17 bandas, números estes ligeiramente superiores aos obtidos com o iniciador UBC155, mas algumas das bandas eram muito fracas. Os

pesos moleculares das bandas variaram entre 246 bp e 3296 bp (Tabela 13, Figura 12). Notou-se que nenhuma das bandas esteve presente em todos os perfis, como havia ocorrido com o primer UBC155.

O maior número de cepas pertencia aos perfis 6 (32 cepas), 9 (31 cepas) e 3 (21 cepas). As cepas do sorogrupo 4 pertenciam aos perfis 1 (cepas 1 e 2), 2 (cepas 3 e 4), 13 (cepas 65, 66, 69 a 72), 15 (cepas 73 e 75) e 16 (cepa 74) (Tabela 12).

Figura 11 - Representação gráfica dos padrões de bandas do DNA, para os perfis 1 a 11, obtidos pelo método RAPD com o iniciador UBC 155.

Tabela 11 - Padrão de bandas do DNA de 115 cepas de *L. monocytogenes*, para os perfis 1 a 11 obtidos pelo método RAPD com o iniciador UBC 155.

Banda (bp)	Perfil										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
246	+	+	+			+		+			
294	+				+						
322						+		+			
369	+			+	+		+		+	+	+
387		+				+		+			
406											+
447							+			+	
492	+			+	+		+	+	+	+	
510				+	+	+	+	+	+	+	
570				+							
592				+			+		+	+	
643					+						
705	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
766				+	+		+	+	+	+	
797	+										
861	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
900	+	+		+	+		+		+	+	
941				+	+		+		+	+	
984	+	+			+				+	+	
1023				+	+		+	+	+	+	+
1064		+		+			+				
1107			+	+	+	+		+	+	+	+
1146		+									
1230				+	+				+	+	
1290	+	+	+			+	+	+			+
1353				+			+			+	+
1413				+	+				+		
1599	+	+	+			+		+			+
1722	+	+	+			+		+			+
1845				+					+		

+ - presença da banda

Tabela 12 - Perfis do DNA de 115 cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de diversas fontes de uma usina processadora de pescados, localizada em Santos, SP, e identificados pelos métodos RAPD e PFGE.

Cepa ^a	Sorogrupo (sorovar)	Perfis de bandas				Perfil composto ^b
		RAPD		PFGE		
		UBC155	UBC127	Apa I	Sma I	
1, 2	4 (4b)	1	1	1	1	A
3, 4	4 (4b)	2	2	2	1	B
5 a 17; 19 a 25	1	3	3	3	2	C
18	1	3	3	4	3	D
36, 37	1	3	7	6	6	E
40, 41, 44	1	3	7	12	6	F
65, 66, 69, 70, 71, 72	4 (4b)	3	13	6	11	G
29	1	5	5	3	5	H
30 a 35, 38, 39, 43, 47 a 50	1	6	6	3	5	I
99 a 116	1	8	6	3	5	J
51, 52, 54 a 58, 63, 77 a 86	1	8	9	3	5	K
53	1	8	9	9	5	L
87 a 94, 96 a 98	1	8	9	15	5	M
95	1	8	9	15	13	N
27, 28	1	4	4	5	4	O
64	1	5	12	11	10	P
42	1	6	6	7	7	Q
45, 46	1	7	8	8	8	R
67, 68	1	10	14	8	8	S
59, 60	1	7	10	8	9	T
61, 62	1	9	11	10	9	U
73, 75	4 (4b)	11	15	13	12	V
76	1	11	15	14	12	W
74	4 (4b)	11	16	13	12	X

^a veja Tabela 7 para identificação das cepas

^b gerado pela combinação dos resultados de RAPD e PFGE

Tabela 13 - Padrão de bandas do DNA de 115 cepas de *L. monocytogenes*, para os perfis 1 a 16 obtidos pelo método RAPD com o iniciador UBC 127.

Ban- da (bp)	Perfil															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
246					+					+						
272															+	
292				+	+			+		+						
301											+	+				
384												+				
400												+				
406	+	+	+		+											
417														+		
447					+	+	+		+							
453											+	+	+		+	
468								+								
492				+			+			+						
514					+			+		+	+	+	+			
537		+			+		+					+		+	+	+
562											+					
588	+	+	+	+		+	+	+	+	+						
615					+						+	+	+	+	+	+
637								+		+						
661	+	+	+	+		+			+				+		+	+
686	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+			
711				+				+	+				+	+		
738					+			+			+	+		+	+	+
761											+		+		+	+
776								+		+						
784												+	+			
809											+	+	+			

+ presença da banda

cont.

Cont. Tabela 13

Ban- da (bp)	Perfil															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
817				+	+											
834											+					
861					+							+	+	+		
890	+	+	+			+	+	+	+	+						
900															+	+
920	+	+	+	+	+	+	+		+							
941											+	+	+	+	+	+
951								+		+						
984				+	+						+	+	+	+		
1107					+						+	+	+		+	+
1146	+			+	+		+	+		+						
1187	+					+	+				+	+	+		+	+
1230						+	+			+			+	+	+	+
1290	+	+		+				+	+	+						
1353	+	+	+		+	+	+		+		+	+	+	+	+	+
1413									+							
1433														+	+	+
1476	+	+	+			+	+		+						+	+
1599														+		
1659												+	+			
1722				+	+			+								
2214											+					
2460														+		
3296											+

Figura 12 - Representação gráfica dos padrões de bandas do DNA, para os perfis 1 a 16, obtidos pelo método RAPD com o iniciador UBC 127.

Dentre os 11 perfis gerados com o iniciador UBC155, 2 foram exclusivos para as linhagens do sorogrupo 4 (perfis 1 e 2) e 7 exclusivos para as linhagens do sorogrupo 1 (perfis 4 a 10) (Tabela 12). Aos perfis 3 e 11 pertenciam cepas dos 2 grupos.

O iniciador UBC127 gerou 4 perfis exclusivos para as linhagens do sorogrupo 4 (perfis 1, 2, 13 e 16) e 11 perfis exclusivos para as linhagens do sorogrupo 1 (perfis 3 a 12 e 14). O perfil 15 foi compartilhado por ambos sorogrupos. Os perfis 2 e 3 foram muito semelhantes, com o último não apresentando apenas 2 bandas: 537 bp e 1290 bp (Figura 12, Tabela 13). O mesmo pode ser dito dos perfis 15 e 16, com as bandas de 272 bp e 453 bp ausentes no perfil 16.

As cepas 1 e 2 podem ser consideradas geneticamente muito próximas pois geraram perfis únicos com ambos os iniciadores, sendo que estes foram completamente diferentes daqueles gerados para outras linhagens. A mesma conclusão pode ser tirada para as cepas 3 e 4; cepas 65, 66 e 69 a 72. Mesmo pertencendo a sorogrupos diferentes, as cepas 73, 75 e 76 foram consideradas idênticas em nível de DNA quando os primers UBC155 e UBC127 foram usados (Tabela 12).

Outras linhagens que são geneticamente relacionadas para estes iniciadores são: 5 a 25; 27 e 28; 30 a 35, 38, 39, 42, 43, 47 a 50; 36, 37, 40, 41, 44; 45 e 46; 51 a 58, 63, 77 a 98; 59 e 60; 61 e 62; 67 e 68; 99 a 116.

As linhagens 29 e 64 apresentaram perfis de DNA idênticos para o iniciador UBC155, mas não para o iniciador UBC127. A linhagem 74 apresentou o mesmo perfil que as linhagens 73, 75 e 76 quando UBC155 foi usado, mas um perfil diferente com UBC127 (Tabela 12).

O método RAPD mostrou-se muito útil para a tipagem de cepas de *L. monocytogenes*, uma vez que polimorfismos do DNA, diferenciáveis e reprodutíveis, foram obtidos.

Este método, assim como a fagotipagem e o RiboPrint, permitiu a diferenciação entre linhagens pertencentes a um mesmo sorogrupo, apesar de algumas vezes ocorrer sobreposição entre os perfis originados para os 2 sorogrupos.

O protocolo de análise, empregado nesta pesquisa, usando células íntegras como molde para a amplificação do DNA alvo, mostrou-se mais rápido, simples e tão eficiente quanto aquele que emprega DNA previamente extraído, e que é adotado por diversos pesquisadores. Porém, quando emprega-se células bacterianas íntegras no RAPD, deve-se ter cuidado com a concentração e procedência da Taq polimerase a ser usada. FARBER & ADDISON (1994) obtiveram resultados reprodutíveis quando empregaram Taq polimerase da Promega na concentração de 0,5U por reação, e DNA previamente extraído. Neste estudo, resultados reprodutíveis

foram obtidos após a elevação da concentração da enzima Taq da Promega para 0,83U por reação.

4.3.3. PFGE

As 115 cepas de *L. monocytogenes* relacionadas na Tabela E, foram submetidas à digestão por enzima de restrição de baixa frequência de corte, seguida de eletroforese, em gel, de campo pulsante (PFGE). Como o DNA genômico de *L. monocytogenes* apresenta percentagem G+C de aproximadamente 38% (SEELIGER & JONES, 1986), o emprego de endonucleases de restrição que reconheçam setores do DNA ricos em guanina e citosina originará baixo número de fragmentos. As enzimas Apa I (GGGCC-C), Sma I (CCC-GGG) e Not I (GC-GGCCGC), entre outras, reconhecem estes setores. Assim, inicialmente testou-se as 3 enzimas com 36 cepas. Apa I e Sma I geraram bons resultados, com bandas claras e bem definidas. Já Not I originou bandas não bem definidas, que apareciam no gel como manchas ("smear") de difícil identificação. Assim, devido a este problema, e ao seu alto custo, o emprego de Not I foi suspenso.

A comparação visual dos padrões de macro-restrição gerados por Sma I, revelou 13 perfis de digestão pela endonuclease (PDEs). O número de bandas variou entre 16 e 25 e os pesos moleculares das bandas estiveram entre 18,2 kb e 339,5 kb (Tabela 14, Figura 13). PDE 5 foi o perfil predominante, tendo sido encontrado em 62 das 115 amostras examinadas.

As 13 cepas do sorogrupo 4 apresentaram 3 PDEs, 2 deles únicos (PDE1, cepas 1 a 4; PDE 11, cepas 65, 66 e 69 a 72) e 1 compartilhado com uma cepa do sorogrupo 1 (PDE 12, cepas 73 a 76) (Tabela 12).

PDEs 2 e 3 foram muito semelhantes, ambos com 20 fragmentos de restrição, sendo 18 deles idênticos para ambos. Os fragmentos diferentes foram 187,8 kb e 339,5 kb para o PDE 2 e os fragmentos 194 kb e 314,3 kb para o PDE 3 (Tabela 14).

Já com a enzima Apa I foram encontrados 15 PDEs, com número de bandas de 11 a 17, ligeiramente inferior ao obtido com Sma I. O tamanho das bandas variou entre 20 kb e 557,2 kb (Tabela 15, Figuras 14 e 15). O perfil mais frequente foi o PDE 3 com 70 das 155 cepas testadas pertencendo a ele (Tabela 12).

Tabela 14 - Padrão de bandas do DNA de 115 cepas de *L. monocytogenes*, para os perfis 1 a 13 obtidos pelo método PFGE, após digestão com a enzima de restrição Sma I.

Banda (kb)	Perfil												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
18,2									+		+		
19,7									+				
20,6									+				
22,3	+	+	+	+	+	+	+		+				
23,2											+		
25,2									+				
26,3					+	+							
27,4					+	+							
28,5	+	+	+	+			+		+	+			
29,7	+	+	+		+	+						+	+
30,9					+				+	+	+		
32,2					+	+							
33,6	+	+	+		+							+	
34,2								+					
35,0				+		+	+		+	+	+		
36,4	+	+	+										
37,9				+	+	+	+		+	+	+		+
39,5	+				+							+	
40,7								+					
41,2				+					+	+			
42,9	+	+	+	+			+		+	+			
44,7						+	+				+	+	+
45,2								+					
46,5		+	+	+	+		+		+	+			
48,5	+	+	+		+	+	+					+	+
50,2								+					
50,5				+									
52,6	+									+	+		
53,8								+					
54,8		+	+	+	+	+	+		+			+	+
57,0	+									+			
59,4		+	+		+	+	+		+			+	+
59,7								+					
61,8								+					
61,9		+	+		+	+			+			+	+
64,5	+			+									

+, presença de banda

cont.

Cont. Tabela 14

Banda (kb)	Perfil												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
67,2											+	+	
68,5								+					
70,0				+					+	+			
72,9		+	+	+	+				+	+			
75,9						+	+		+			+	+
76,1								+					
79,1	+									+			
82,4	+	+	+		+	+	+				+	+	+
89,4	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
91,8								+					
97,0	+			+			+				+	+	+
99,6								+					
100,0									+				
102,3								+					
103,2		+	+	+	+	+	+			+			+
106,5									+				
109,8	+									+	+		
111,0								+					
113,3						+							
116,9	+			+					+	+			
117,2								+					
127,1								+					
128,4	+	+	+	+	+				+			+	
132,5		+	+		+	+	+			+	+		+
137,8								+					
145,5				+				+	+	+			
150,2										+		+	
160,1		+	+		+		+						+
172,0								+					
176,2				+									
187,8	+	+				+				+	+	+	+
194,0			+		+		+						
227,5	+					+					+	+	
257,6									+				
314,3			+				+						
339,5	+	+			+	+					+	+	+

13982

Figura 13 - Representação gráfica dos padrões de bandas do DNA, para os perfis 1 a 13, obtidos pelo método PFGE, após digestão com a enzima de restrição Sma I.

Tabela 15 - Padrão de bandas do DNA de 115 cepas de *L. monocytogenes*, para os perfis 1 a 15 obtidos pelo método PFGE, após digestão com a enzima de restrição Apa I.

Banda (kb)	Perfil														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
20,0						+								+	
24,2						+									
25,8														+	
33,2		+	+											+	
37,6		+													+
40,1	+													+	
42,7			+	+					+			+			+
45,5	+				+	+	+				+				
48,5								+		+			+		
51,6	+		+			+			+	+	+	+		+	+
54,4								+							
55,0				+			+								
58,5	+	+	+		+	+			+	+	+	+	+		+
61,1								+							
62,4				+			+							+	
64,7								+							
66,4	+	+	+		+	+			+	+	+		+		+
70,7				+							+			+	
72,6								+							
75,3					+					+		+			
80,2	+	+				+	+		+				+	+	+
81,5								+							
85,5			+	+							+				
91,0					+										
92,2										+					
92,7								+							
97,0						+					+	+	+		+
100,6	+	+												+	
101,4								+							
102,0										+					
104,4									+		+				
107,3							+								
108,3			+	+	+	+									
111,0								+							
112,4		+									+			+	

+, presença da banda

cont.

Cont. Tabela 15

Banda (kb)	Perfil														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
116,6									+						
118,8							+								
121,0	+		+	+											
124,9										+					
125,5						+			+						
130,2			+	+											
131,4							+								
135,1					+	+					+				
139,0								+							
140,2									+					+	+
145,5	+	+	+	+						+			+		
150,2							+					+			
155,1						+							+		+
160,1	+				+				+	+		+			
165,3			+	+			+							+	
170,7		+				+		+	+	+	+				+
176,2			+	+	+								+		
181,9								+			+	+	+		+
187,8	+	+		+			+							+	
223,0														+	
225,1	+	+													
227,5												+			
235,8									+						+
236,5			+	+									+		
242,5		+					+							+	
249,9												+			
255,4	+										+				
262,2						+		+					+		+
265,6										+					
276,2			+	+					+						
282,2							+								
283,5			+						+				+		+
291,0									+			+		+	
298,5		+	+	+											
300,1							+								
314,3				+	+										
319,1							+								
322,4	+														
358,1														+	
367,8													+		+

cont.

Cont. Tabela 15

Banda (kb)	Perfil														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
375,2												+			
377,7		+													
416,4	+														
423,8											+				
436,5					+			+							
472,3												+			
485,0											+				
516,8									+						
557,2											+				

As linhagens do sorogrupo 4 apresentaram 4 PDEs únicos (PDE1, cepas 1 e 2; PDE 2, cepas 3 e 4; PDE 6, cepas 65, 66 e 69 a 72; PDE 13, cepas 73 a 75) (Tabela 12).

Comparando-se os PDEs obtidos, nota-se que algumas cepas compartilham um mesmo padrão de restrição para ambas as enzimas. Estas cepas puderam ser consideradas geneticamente relacionadas, quando Sma I e Apa I foram usadas. São elas: 1 e 2; 3 e 4; 65, 66 e 69 a 72; 73, 74 e 75.

Outras cepas também geneticamente relacionadas, para estas enzimas, foram: 5 a 17 e 19 a 25; 27 e 28; 29 a 35, 38, 39, 43, 47 a 52, 54 a 58, 63, 77 a 86 e 99 a 116; 36 e 37; 40, 41 e 44; 45 e 46; 59 e 60; 61 e 62; 67 e 68; 87 a 94 e 96 a 98 (Tabela 12).

As cepas 18, 42 e 64 apresentaram PDEs únicos para ambas enzimas, podendo assim serem consideradas cepas independentes (Tabela 12). A cepa 53 pertenceu ao PDE mais frequente (PDE 5) quando digerida por Sma I, mas apresentou PDE exclusivo (PDE 9) quando digerida por Apa I. A cepa 76 apresentou o mesmo PDE que cepas do sorogrupo 4 (PDE 12) quando digerida com Sma I, mas mostrou PDE único (PDE 14) quando digerida por Apa I (Tabela 12). A cepa 95 revelou mesmo PDE que as cepas 87 a 98 quando submetida a ação de Apa I (PDE 15), mas com Sma I apresentou PDE exclusivo (PDE 13).

PFGE também mostrou ser um bom método de tipagem de cepas bacterianas, por ser sensível, reprodutível e pouco suscetível a variações. Como ponto negativo tem-se o longo tempo necessário para a realização da tipagem, que consome entre o preparo das células e a leitura do gel 7 dias, contra 3 despendidos com o RAPD.

O emprego de mais de uma enzima de restrição aumentou o poder discriminatório do método, permitindo a sub-tipagem de cepas pertencentes a um mesmo sorogrupo ou sorovar.

De acordo com o perfil composto gerado pela combinação dos resultados obtidos pelos 2 métodos empregados, as 115 cepas de *L. monocytogenes* puderam ser divididas em 24 grupos, sendo C, J e K os perfis compostos mais frequentes, com 20, 18 e 18 cepas respectivamente (Tabela 12).

1: Padrão
 2: Perfil 1
 3: Perfil 2
 4: Perfil 3
 5: Perfil 4
 6: Perfil 5
 7: Perfil 13

1: Padrão
 2: Perfil 8

Figura 14 - Representação gráfica dos padrões de bandas do DNA, para os perfis 1 a 5, 13 e 8, obtidos pelo método PFGE, após digestão com a enzima de restrição Apa I.

Figura 15 - Representação gráfica dos padrões de bandas do DNA, para os perfis 9, 11, 6, 14, 15, 7, 10 e 12, obtidos pelo método PFGE, após digestão com a enzima de restrição Apa I.

As 13 cepas pertencentes ao sorovar 4b puderam ser divididas em 5 grupos (A, B, G, V e X) com o grupo G sendo o mais frequente (Tabela 16). As cepas pertencentes aos sorovares 1/2a e 1/2b puderam ser divididas em 5 grupos cada: O, R, S, T e U e C, F, I, J, K respectivamente (Tabela 16).

Combinando-se os resultados obtidos com os diversos métodos de tipagem empregados para as 25 cepas, verifica-se que algumas delas foram, consistentemente alocadas nos mesmos grupos. São elas: 1 e 2; 3 e 4; 65, 69, 70 e 72; 73 e 75; 33 e 39; 52 e 54. Esta é uma forte indicação de que estas cepas são geneticamente idênticas, podendo ser consideradas pertencentes a um mesmo clone ou uma derivação recente deste, segundo critérios apresentados por BROSCHE et alii. (1991a).

Diversos grupos de pesquisadores têm utilizado RAPD (MAZURIER et alii., 1992; MAZURIER & WERNARS, 1992; CZAJKA et alii., 1993; LAWRENCE et alii., 1993; MACGOWAN et alii., 1993; FARBER & ADDISON 1994) ou PFGE (BROSCH et alii., 1991a; BROSCHE et alii., 1991b, BUCHRIESER et alii., 1991; CARRIERE et alii., 1991; HOWARD et alii., 1992; MOORE et alii., 1992; BUCHRIESER et alii., 1993; YAN et alii., 1993; BROSCHE et alii., 1994a, b; PEREIRA et alii., 1994) para tipar *L. monocytogenes*, mas nenhuma pesquisa empregando os dois métodos simultaneamente foi ainda relatada.

Tabela 16 - Perfis do DNA de 25 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de diversas fontes de uma usina processadora de pescados, em Santo, SP, e identificados com RAPD e PFGE

Cepa ^a	Soro- var	Perfis de bandas				Perfil composto ^b
		RAPD		PFGE		
		UBC 155	UBC 127	<u>Sma</u> I	<u>Apa</u> I	
1 e 2	4b	1	1	1	1	A
3 e 4	4b	2	2	1	2	B
65, 69, 70, 72	4b	3	13	11	6	G
73 e 75	4b	11	15	12	13	V
74	4b	11	16	12	13	X
16	1/2b	3	3	2	3	C
33 e 39	1/2b	6	6	5	3	I
40	1/2b	3	7	6	12	F
52 e 54	1/2b	8	9	5	3	K
100	1/2b	8	6	5	3	J
29	1/2c	5	5	5	3	H
64	1/2c	10	11	5	12	P
46	1/2a	7	8	8	8	R
68	1/2a	10	14	8	8	S
27	1/2a	4	4	4	5	O
59	1/2a	7	10	9	8	T
61	1/2a	9	11	9	10	U

^a veja Tabela 7 para identificação das cepas

^b gerado pela combinação dos resultados de RAPD e PFGE

O perfil composto gerado pela combinação dos resultados obtidos com os 2 iniciadores no RAPD, e as 2 enzimas no PFGE, aumentou ainda mais o poder discriminatório, permitindo melhor distinção entre as linhagens de *L. monocytogenes* pertencentes a um mesmo sorogrupo, ou sorovar, fagovar ou mesmo RiboGroup.

A análise dos dados gerados por ambos os métodos é difícil, pois não existem critérios padronizados e estabelecidos para este fim. Assim, um mesmo dado pode ser tratado de maneiras diferentes pelos pesquisadores, dificultando a comparação dos resultados.

Poucos pesquisadores tem empregado a tipagem de cepas bacterianas para identificar fontes de contaminação em usinas processadoras de alimentos ou abatedouros. DODD et alii. (1988) empregaram a determinação do perfil plasmidial para identificar a fonte de contaminação por *S. aureus* endêmico em um abatedouro de aves do Reino Unido. DYKES et alii. (1994) também empregaram o perfil plasmidial para monitorar a presença de *Listeria* spp. em amostras, ambientais e de produto, colhidas em um abatedouro de aves na África do Sul. Eles verificaram que os perfis plasmidiais encontrados eram gênero-específico. WENGER et alii. (1990) utilizaram MEE na identificação da fonte de contaminação de salsichas de peru, por *L. monocytogenes*. Eles encontraram cepas isoladas a partir das amostras colhidas da esteira de transporte do descascador de salsichas, com o mesmo perfil de isoenzima que aquele apresentado pelas cepas isoladas em um caso de listeriose humana causado por salsicha de peru.

Neste estudo empregou-se a tipagem molecular como uma ferramenta para mapear a distribuição de *L. monocytogenes* em uma linha de processamento de camarão rosa congelado.

Para facilitar o estudo dos diferentes grupos de perfis compostos presentes nesta linha, a mesma foi artificialmente dividida em 4 áreas distintas (Figura 16): 1) recepção; 2) controle de qualidade; 3) processamento e 4) produto final.

A Tabela 17 apresenta os diferentes perfis compostos presentes em cada área, de acordo com o tipo de amostra.

As cepas de *L. monocytogenes* isoladas dos diferentes tipos de amostra coletadas na área externa não apresentaram perfis compostos em comum, ou seja, as cepas de *L. monocytogenes* originárias de amostras ambientais, de água, utensílios e camarões não eram geneticamente relacionadas. O mesmo pode ser concluído com relação às cepas provenientes da área do controle de qualidade.

Já para as áreas de processamento e de produto congelado, verifica-se que pelo menos 1 perfil composto (K) esteve presente em cepas provenientes de 2 tipos de amostra (camarão e manipulador) coletadas nestas áreas.

A discussão que segue está relacionada às Tabelas 7 e 18 e à Figura 16.

Figura 16 - Representação esquemática da linha de processamento industrial de camarão rosa (*Penaeus brasiliensis*) indicando as 4 áreas em que a mesma foi dividida.

Tabela 17 - Perfis compostos do DNA de cepas de *L. monocytogenes* presentes nas diferentes áreas de uma usina processadora de pescados, localizada em Santos, SP.

Tipo da amostra	Área			
	Recepção	Controle de qualidade	Processamento	Produto final
Ambiental	A, B	C ^a	C ^a	C ^a , D
Água	O	I ^b , H	- ^e	I ^b
Utensílios	I ^b , E	-	I ^b , F, Q, R	-
Camarão	K ^C , T	K ^C , U, P	K ^C , J ^d , G, S, V, X, W, M, N	K ^C , J ^d
Manipulador	-	-	K ^C	K ^C , L

a, b, c, d indica que o grupo foi encontrado em outras áreas e/ou tipo de amostra
^e *L. monocytogenes* não detectada

O perfil composto C foi encontrado somente nas cepas de *L. monocytogenes* isoladas a partir de amostras ambientais colhidas nas áreas de controle de qualidade, processamento e produto final (cepas 5 a 17 e 19 a 25). Pode-se concluir que as cepas de *L. monocytogenes* perfil composto C são parte da microbiota normal da parte interna da usina, enquanto que os grupos A (cepas 1 e 2) e B (cepas 3 e 4) são exclusivos da área de recepção, estando restrito àquela área. As cepas dos grupos A e B pertenciam ao sorovar 4b.

Apesar de a água usada na indústria apresentar níveis adequados de cloro, *L. monocytogenes* foi isolada das amostras de água que estavam em uso em diferentes pontos da linha de processamento, cepas pertencentes ao perfil composto I estiveram presentes nas amostras de água coletadas na área do controle de qualidade (água do tanque de lavagem interno -A₂, cepas 30 e 31) e na área do produto final (água do "glazing"- A₅ - cepas 32 a 35). A este mesmo grupo I pertenciam cepas isoladas das caixas plásticas usadas para acondicionar pescados na área de recepção da usina (cepas 38 e 39) e cepas isoladas de utensílios da área de processamento (cepas 42, 43 e 47 a 50). Uma hipótese para explicar esta contaminação é que as caixas plásticas, usadas para transportar os camarões da área de recepção para o interior da usina, podiam abrigar *L. monocytogenes* do grupo I, que foram transferidas para a água de lavagem do tanque interno quando os camarões foram despejados nele. Após a remoção dos camarões do tanque um pouco desta água foi levada com eles, sendo transferida para os escorredores de plástico usados na primeira classificação. A presença de *L. monocytogenes* grupo I nas

bandejas de congelamento (cepas 47 a 50) não pode ser explicada.

Tabela 18 - Resumo dos resultados obtidos, relacionando as cepas isoladas nos diferentes pontos de amostragem e seu perfil composto.

Cepas ^a	Ponto de amostragem ^b	Perfil composto ^c
1, 2, 3, 4	AB ₁	A, A, B, B
5, 6, 7, 8	AB ₃	C, C, C, C
9, 10, 11, 12	AB ₄	C, C, C, C
13, 14	AB ₆	C, C
15, 16, 17	AB ₉	C, C, C
18	AB ₁₀	D
19, 20, 21, 22	AB ₁₁	C, C, C, C
23, 24, 25 ^c	AB ₁₂	C, C, C
27, 28	A ₁	O, O
29, 30, 31	A ₂	H, I, I
32, 33, 34, 35	A ₅	I, I, I, I
36, 37, 38, 39	U ₁	E, E, I, I
40, 41, 42, 43	U ₂	F, F, Q, I
44	U ₃	F
45, 46	U ₅	R, R
47, 48, 49, 50	U ₆	I, I, I, I
51, 52	M ₁	K, K
53	M ₅	L
54, 55, 56, 57	M ₆	K, K, K, K
58	P ₁	K
59, 60	P ₂	T, T
61, 62, 63, 64	P ₃	U, U, K, P
65, 66, 67, 68, 69, 70	P ₄	G, G, S, S, G, G
71, 72, 73, 74, 75, 76	P ₄	G, G, V, X, V, W
77, 80, 81	P ₄	K, K, K
82, 83, 84, 85, 86, 87	P ₅	K, K, K, K, K, M
88, 89, 90, 91	P ₅	M, M, M, M
92, 93, 94, 95, 96, 97	P ₆	M, M, M, N, M, M
98, 99, 100	P ₆	M, J, J
101 a 111	P ₇	J (todas)
78, 79	P ₈	K, K
112 a 116	P ₈	J (todas)

^a - Veja Tabela 7 para identificação das cepas

^b - pontos de amostragem indicados nas figuras 3, 4 e 5

^c - número 26 foi omitido quando da numeração das cepas

Alguns grupos de perfis compostos foram exclusivos para a água (Grupos O - cepas 27 e 28, e H - cepa 29) ou para alguns utensílios (grupos E - cepas 36 e 37, Q - cepa 42 e R - cepas 45 e 46). Cepas pertencentes ao grupo F foram isoladas de utensílios amostrados em dois pontos diferentes da área de processamento: U₂ - escorredores plásticos usados na classificação inicial (cepas 40 e 41) e U₃ - superfície da mesa da classificação inicial (cepa 44).

Algumas cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras de camarão e de manipuladores apresentaram o mesmo perfil composto K. Este grupo foi encontrado nas amostras de camarão colhidas nas 4 áreas da planta (Tabela 17), em diversos pontos da linha de processamento: na plataforma de recepção (P₁ - cepa 58); após a primeira lavagem no interior da usina (P₄ - cepas 77, 80 e 81), após o descascamento (P₅ - cepas 82 a 86) e após a embalagem (P₆ - cepas 78 e 79) e de mãos de operários da primeira classificação (M₁ - cepas 51 e 52) e do empacotamento (M₆ - cepas 54 a 57).

Duas hipóteses podem ser levantadas para explicar a presença de *L. monocytogenes* grupo K em amostras de camarão colhidas imediatamente após o desembarque, na área de recepção do produto. A primeira está relacionada à pesca em áreas poluídas, uma vez que microrganismos patogênicos, que não *Vibrio* spp. e *C. botulinum*, não são comuns ao ambiente marinho (WARD & HACKNEY, 1991). A segunda hipótese está relacionada às práticas sanitárias inadequadas durante o manuseio dos camarões nos barcos. Câmaras de estocagem não higienizadas, convés sujos, presença de aves marinhas (sabidamente portadoras de *Listeria*

spp), pás não higienizadas, abusos de temperatura permitindo a multiplicação destes microrganismos, são algumas das condições inadequadas que podem levar à contaminação do produto ou à multiplicação das bactérias existentes.

No caso específico desta usina, o gelo não representava uma fonte de contaminação por *L. monocytogenes*. Todo o gelo que ia para os barcos, para ser usado na conservação do pescado, era fornecido pela empresa e elaborado com água potável. *L. monocytogenes* não foi isolada das amostras de gelo recém saído da máquina produtora, nem daquelas colhidas do gelo que cobria os camarões quando do desembarque.

A presença de *L. monocytogenes* grupo K nas mãos das operárias é provavelmente decorrente da contaminação destas pela manipulação de camarões contaminados. Ao contrário do que se havia suposto inicialmente, os manipuladores não tiveram papel importante na disseminação de *L. monocytogenes* nesta usina processadora e as cepas isoladas de suas mãos, que não as do grupo K, não foram isoladas de nenhuma outra amostra.

Cepas de *L. monocytogenes* com perfil composto T foram exclusivas das amostras de camarão coletadas após a lavagem na área de recepção (P₂ - cepas 59 e 60). Após serem lavadas na área do controle de qualidade, as amostras de camarão abrigavam cepas de *L. monocytogenes* dos grupos U (cepas 61 e 62) e P (cepa 64), além das do grupo K.

Houve um aumento na variedade de grupos de perfis compostos presentes nas etapas desenvolvidas na área do

processamento. Na classificação (P₄) além do grupo K, cepas de *L. monocytogenes* pertencentes a 5 grupos exclusivos e diferentes foram isoladas, grupos G (cepas 65, 66, 69 a 72), S (cepas 67 e 68), V (cepas 73 e 75), X (cepa 74) e W (cepa 76). As cepas dos grupos G, V e X pertenciam ao sorovar 4b.

Após o descascamento (P₅) o camarão abrigava, além das cepas do grupo K, cepas pertencentes ao perfil composto M (cepas 87 a 91). Este perfil também estava presente nos camarões colhidos na etapa de evisceração - P₆ (cepas 92 a 94 e 96 a 98) e não foi mais detectado. Este grupo pode ter sido introduzido ao camarão durante a etapa de descascamento, quando parte do conteúdo do cefalotórax pode extravasar e contaminar o músculo.

No ponto de amostragem P₆, cepas de *L. monocytogenes* de 2 outros perfis compostos foram detectadas - grupos N e J. Grupo N (cepa 95) foi exclusivo para este ponto, já o grupo J (cepas 99 e 100) também estava presente nas amostras coletadas antes da classificação final (P₇ - cepas 101 a 111) e no produto final (P₈ - cepas 112 a 116).

É interessante notar que somente 2 grupos de perfis compostos (J e K) foram encontrados no produto final, apesar de 9 grupos diferentes estarem presentes nos camarões durante o processamento (Tabela 17). Isto pode indicar que algumas cepas de *L. monocytogenes* apresentam melhor capacidade de sobrevivência que outras, principalmente no que diz respeito a sua habilidade em suportar o congelamento. Além disso, verifica-se que nenhuma das linhagens recuperadas do ambiente, água ou utensílios foi também recuperada do camarão. Esta pode ser uma

indicação que as linhagens "ambientais" podem não ser boas competidoras, ou que estas não sobrevivem por períodos suficientemente longos para entrar em contato com o camarão.

A persistência de *L. monocytogenes* de um mesmo perfil genético do início ao fim do processamento indica que esta contaminação, mesmo que estivesse restrita ao exoesqueleto dos camarões, poderia ser transferida para o músculo, contaminando-o. A sobrevivência destas cepas ao processo de congelamento é preocupante pois afeta a segurança microbiológica do produto final.

A variedade de linhagens diferentes de *L. monocytogenes* recuperadas dos camarões na área de processamento - 9 - também é digna de nota, pois contrasta com a variedade de linhagens recuperadas de outros tipos de amostras, que variou de 2 a 5 para manipuladores e utensílios, respectivamente. Estas diferenças na variedade de linhagens presentes nos vários tipos de amostras podem refletir a adaptação de certas cepas a um habitat ou nicho específico.

As etapas de limpeza e sanificação das instalações, e também dos barcos, devem ser executadas com muita atenção e cuidado. Deve-se ainda cuidar da higiene do produto durante toda a cadeia de produção, desde sua pesca até o produto final, a fim de evitar a re-introdução de *L. monocytogenes* na usina e consequentemente no produto final.

Como existem diferentes fontes de *L. monocytogenes* nesta unidade processadora de camarão rosa, a eliminação deste microrganismo do produto final será uma tarefa difícil, se não impossível. Esta conclusão é reforçada pela afirmação da Organização Mundial da Saúde de que "a eliminação total de *L. monocytogenes* dos alimentos é impraticável e pode ser impossível" (FARBER, comunicação pessoal).

O desenvolvimento e o uso de um plano de análise de perigos e pontos críticos de controle seria de grande valia para esta empresa, pois permitiria a melhoria da qualidade microbiológica de seus produtos, principalmente no que diz respeito à redução ou eliminação da presença de *L. monocytogenes*

5. Conclusões

De acordo com as condições experimentais empregadas neste trabalho e baseado na discussão desenvolvida, pode-se concluir que:

- Das 363 amostras examinadas, 64 (17,6%) revelaram-se positivas para *L. monocytogenes*. Todas as amostras de gelo foram negativas para a espécie.

- As amostras colhidas do ambiente, utensílios e água apresentaram maiores índices de contaminação por *L. monocytogenes* (25%, 24,2% e 23,8%, respectivamente).

- *L. monocytogenes* foi isolada em 5 (7,6%) das 66 amostras de mãos de operários da linha de processamento de camarão rosa (*Penaeus brasiliensis*).

- Dentre as 178 amostras de camarão rosa examinadas, 32 (18,0%) foram positivas para *L. monocytogenes*, 30 (16,9%) para *L. innocua*, 40 (22,5%) para *L. seeligeri*, 11 (6,2%) para *L. ivanovii* e 3 (1,7%) para *L. welshimeri*.

- A percentagem de amostras de camarão positivas para *L. monocytogenes* aumentou no decorrer do processamento. As amostras colhidas imediatamente após o desembarque, apresentaram 5,3% de positividade enquanto que 16% das amostras do produto final foram positivas para a espécie. Em algumas etapas do processamento encontrou-se até 35% de amostras positivas para *L. monocytogenes*.

- Dentre as 115 cepas de *L. monocytogenes* selecionadas, 13 pertenciam ao sorogrupo 4 e 102 ao sorogrupo 1.

- Dentre as 25 cepas de *L. monocytogenes* submetidas a sorotipagem completa, 11 pertenciam ao sorovar 4b, 7 ao sorovar 1/2b, 2 ao sorovar 1/2c e 5 ao sorovar 1/2a.

- A fagotipagem, com o conjunto de fagos internacionais, permitiu que as 25 cepas de *L. monocytogenes* fossem divididas em 7 grupos.

- Das cepas pertencentes ao sorogrupo 1/2, 85,7% puderam ser fagotipadas enquanto que somente 18,2% das cepas pertencentes ao sorogrupo 4 o foram.

- Com o sistema RiboPrint™, as 25 cepas de *L. monocytogenes* puderam ser agrupadas em 6 RiboGroups (dd0647, dd0653, dd6323, dd1966, dd0566 e dd7745).

- Empregando-se o método RAPD e o iniciador UBC155, identificou-se 11 perfis diferentes de DNA dentre as 115 cepas de *L. monocytogenes* examinadas. Os pesos moleculares dos fragmentos gerados variaram entre 246bp e 1845bp. Os fragmentos de 705bp e de 861 bp estiveram presentes nos 11 perfis.

- Com o método RAPD e o iniciador UBC127 identificou-se 16 perfis de DNA, sendo que os pesos moleculares dos fragmentos variaram entre 246bp e 3296bp.

- O emprego de células íntegras como molde para a amplificação do DNA alvo mostrou-se mais simples, rápido e tão eficiente quanto o emprego de DNA previamente extraído.

- Para as 115 cepas de *L. monocytogenes* estudadas, o emprego da enzima de restrição Sma I seguida de PFGE com o sistema CHEF, revelou 13 perfis de DNA. Os pesos moleculares dos fragmentos variaram entre 18,2 kb e 339,5 kb.

- Para a enzima Apa I foram determinados 15 perfis, com fragmentos de peso molecular entre 20 kb e 557,2 kb.

- Os resultados obtidos com os dois iniciadores quando combinados com aqueles originados pelas duas enzimas de restrição empregadas permitiu a divisão das 115 cepas de *L. monocytogenes* em 24 grupos de acordo com seus perfis de DNA.

- As cepas de *L. monocytogenes* isoladas dos diferentes tipos de amostra coletadas na área de recepção da usina processadora não apresentaram perfis compostos em comum. O mesmo ocorreu com as cepas provenientes das amostras coletadas na área do controle de qualidade.

- Nas áreas de processamento e de produto congelado, verificou-se que pelo menos 1 perfil composto esteve presente em cepas provenientes de 2 tipos de amostras, manipuladores e camarão.

- As cepas pertencentes ao perfil composto C parecem ser parte da microbiota do ambiente da parte interna da usina, enquanto que as dos perfis compostos A e B são exclusivas do ambiente da recepção de produto ficando restritas a estes.

- Cepas pertencentes ao perfil composto I estiveram presentes em amostras de água coletadas nas áreas de controle de qualidade e de produto final, bem como nas amostras de utensílios das áreas de recepção e de processamento.

- Cepas de *L. monocytogenes* com perfil composto K foram encontradas nas amostras de camarão colhidas nas 4 áreas da planta, desde a recepção até o produto final. O mesmo perfil foi também encontrado em cepas isoladas das mãos dos manipuladores da área de processamento e do produto final.

- Cepas de *L. monocytogenes* pertencentes ao perfil composto J estavam presentes em amostras de camarão coletadas na área de processamento e também no produto final.

6. Referências Bibliográficas*

- ADESIYUN, A. A. Prevalence of *Listeria* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. and toxigenic *Escherichia coli* on meat and seafood in Trinidad. Food Microbiol., London, v. 10, n. 5, p. 395-403, 1993.
- ALLARDET-SERVENT, A., BOUZIGES, N., CARLES-NURIT, M. -J., BOURG, G., GOUBY, A. , RAMUZ, M. Use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases for DNA analysis in epidemiological investigations of nosocomial bacterial infections. J. Clin. Microbiol., Washington, v. 27, n. 9, p. 2057-2061, 1989.
- ARBEIT, R. D., ARTHUR, M., DUNN, R., KIM, C., SELANDER, R. K., GOLDSTEIN, R. Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology. J. Infect. Dis., Chicago, v. 161. p. 230-235, 1990.
- ARCHER, D. L. *Listeria monocytogenes*: what is its ecological niche? In: MILLER, A. L., SMITH, J. L., SOMKUTI, G. A., eds. Foodborne listeriosis. Amsterdam: Elsevier, 1990, p. 5-8.
- ARCHER, D. L. Review of the latest FDA information on the presence of *Listeria* in foods. Geneva: WHO, 1988 [WHO Working Group on Foodborne Listeriosis].
- AUDURIER, A., MARTIN, C. Phage typing of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., Amsterdam, v. 8, p. 251-257, 1989.
- BALOGA, A. O., HARLANDER, S. K. Comparison of methods for discrimination between strains of *Listeria monocytogenes* from epidemiological surveys. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v. 57, p. 2324-2331, 1991.
- BARNIER, E., VINCENT, J. P., CATTEAU, M. *Listeria* et environnement industriel. Sci. Aliment., Paris, v. 8, p. 239-242, 1988.

* De acordo com a norma NBR6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1990.

- BIBB, W. F., GELLIN, B. G., WEAVER, R., SCHWARTZ, B., PLIKAYTIS, B. D., REEVES, M. W., PINNER, R. W., BROOME, C. V. Analysis of clinical and food-borne isolates of *Listeria monocytogenes* in the United States by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 56, n. 7, p. 2133-2141, 1990.
- BILLE, J. Listeriose en Suisse: les leçons d'une épidémie. In: INTERNATIONAL CONFERENCE *LISTERIA* AND FOOD SAFETY. Laval, 1991, Proceedings. Laval, ASEPT, 1991, p. 63-65.
- BOERLIN, P., BANNERMAN, E., ISCHER, F., BILLE, J. Typing *Listeria monocytogenes* with RAPD - a comparison with four other methods. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. 94. Las Vegas, 1994, Abstracts. Las Vegas, ASM, 1994. p.372 abstr. P-22.
- BOERLIN, P., ROCOURT, J., GRIMONT, F., GRIMONT, P. A. D., JACQUET, C., PIFFARETTI, J. -C. *Listeria ivanovii* subsp. *londoniensis* subsp. nov.. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, v. 42, n. 1, p. 69-73, 1992.
- BROSCH, R., BUCHRIESER, C., ROCOURT, J. Subtyping of *Listeria monocytogenes* serovar 4b by use of low-frequency cleavage restriction endonucleases and pulsed-field gel electrophoresis. *Res. Microbiol.*, Paris, v. 142, p. 667-675, 1991a.
- BROSCH, R., BUCHRIESER, C., SIXL-VOIGT, B., ROCOURT, J. Use of pulsed field electrophoresis of DNA restriction fragments for comparing *Listeria monocytogenes* strains isolated from human infections and food in Austria. *Zentralbl. Bakteriolog.*, Stuttgart, v. 275, p. 557-560, 1991b.
- BROSCH, R., CHEN, J., LUCHANSKY, J. B. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* using contour clamped homogeneous electric fields (CHEF) electrophoresis and *Listeria monocytogenes*-specific DNA probes. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. 94. Las Vegas, 1994, Abstracts. Las Vegas, ASM, 1994. p.377 abstr. P-47.
- BROSCH, R., CHEN, J., LUCHANSKY, J. B. Pulsed-field fingerprinting of *Listeriae*: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 60, n. 7, p. 2584-2596, 1994b.

- BRYAN, F. L. Risks associated with vehicles of foodborne pathogens and toxins. *J. Food Prot.*, Ames, v. 51, p. 498-508, 1988.
- BUCHANAN, R. L., STAHL, H. G., BENCIVENGO, M. M., CORRAL, F. D. Comparison of lithium chloride-phenylethanol moxalactam and modified Vogel-Johnson agars for detection of *Listeria* spp. in retail-level meats, poultry, and seafood. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 55, n. 3, p. 599-603, 1989.
- BUCHRIESER, C., BROSCHE, R., CATIMEL, B., ROCOURT, J. Pulsed-field gel electrophoresis applied for comparing *Listeria monocytogenes* strains involved in outbreaks. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, v. 39, p. 395-401, 1993.
- BUCHRIESER, C., BROSCHE, R., ROCOURT, J. Use of pulsed field gel electrophoresis to compare large DNA-restriction fragments of *Listeria monocytogenes* strains belonging to serogroups 1/2 and 3. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 14, p. 297-304, 1991.
- CARRIERE, C., ALLARDET-SERVENT, A., BOURG, G., AUDURIER, A., RAMUZ, M. DNA polymorphism in strains of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 29, n. 7, p. 1351-1355, 1991.
- CASOLARI, C., FACINELLI, B., FABIO, U., ROCOURT, J., VARALDO, P. E. Restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA from *Listeria monocytogenes* strains. *Eur. J. Epidemiol.*, Roma, v. 6, n. 3, p. 319-322, 1990.
- CASOLARI, C., NEGLIA, R., MALAGOLI, M., FABIO, U. Foodborne sporadic neonatal listeriosis confirmed by DNA fingerprinting. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. 94. Las Vegas, 1994, Abstracts. Las Vegas, ASM, 1994. p.382 abstr. P-77.
- CHARLTON, B. R., KINDE, H., JENSEN, L. H. Environmental survey for *Listeria* species in California milk processing plants. *J. Food Prot.*, Ames, v. 53, n. 3, p. 198-201, 1990.
- CHEESE, seafood subject to Class I recalls due to *Listeria* contamination. *Food Chem. News*, v. 35, n. 13, p. 16-17, 1993a.
- CHEESE, tuna recalled because of *Listeria* contamination. *Food Chem. News*, v. 34, n. 52, p. 44, 1993b.

- CLARKE, A. M. T., MAPSTONE, N. P., QUIRKE, P. Molecular biology made easy. The polymerase chain reaction. *Histochem. J.*, London, v. 24, p. 913-926, 1992.
- COLBURN, K. G., KAYSNER, C. A., ABEYTA Jr., C., WEKELL, M. M. *Listeria* species in a California coast estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 56, n. 7, p. 2007-2011, 1990.
- COX, L. J., KIEISS, T., CORDIER, J. L., CORDELLANA, C., KONKEL, P., PEDRAZZINI, C., BEUMER, R., SIEBENGA, A. *Listeria* spp. in food processing, non-food and domestic environments. *Food Microbiol.*, London, v. 6, p. 49-61, 1989.
- CZAJKA, J., BATT, C. A. Verification of causal relationships between *Listeria monocytogenes* isolates implicated in food-borne outbreaks of listeriosis by randomly amplified polymorphic DNA patterns. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 32, n. 5, p. 1280-1287, 1994.
- CZAJKA, J., BSAT, N., PIANI, M., RUSS, W., SULTANA, K., WIEDMANN, M., WHITAKER, R., BATT, C. A. Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by 16S rRNA genes and intraspecies discrimination of *Listeria monocytogenes* strains by random amplified polymorphic DNA polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 59, n. 1, p. 304-308, 1993.
- de SIMÓN, M., TARRAGO, C., FERRER, M. D. Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh foods in Barcelona (Spain). *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 153-156, 1992.
- DECASTELLI, L., ERCOLINI, C., FISICHELLA, S., BIANCHI, C. Incidenza di *Listeria* spp. in mitili (*Mytilus galloprovincialis*) di allevamento. *Microbiol. Aliments Nutr.*, Chatenay-Malabry, v. 11, p. 51-56, 1993.
- DILLON, J.-A., BEZANSON, G. S., YEUNG, K.-H. Basic techniques. In: DILLON, J.-A. R., NASSIM, A., NESTMANN, E. R., eds. Recombinant DNA methodology. New York: Wiley, 1985. p. 27-30.
- DILLON, R., PATEL, T., RATNAM, S. Occurrence of *Listeria* in hot and cold smoked seafood products. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 22, p. 73-77, 1994.
- DILLON, R., PATEL, T., RATNAM, S. Prevalence of *Listeria* in smoked fish. *J. Food Prot.*, Ames, v. 55, n. 11, p. 866-870, 1992.

- DODD, C. E. R. The application of molecular typing techniques to HACCP. *Trends Food Sci. Technol.*, Cambridge, v. 5, p. 160-164, 1994.
- DODD, C. E. R., CHAFFEY, B. J., WAITES, W. M. Plasmid profiles as indicators of the source of contamination of *Staphylococcus aureus* endemic within poultry processing plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 54, n. 6, p. 1541-1549, 1988.
- DONABEDIAN, S., CHOW, J. W., SHLAES, D. M., GREEN, M., ZERVOS, M. J. DNA hybridization and contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis for identification of enterococci to the species level. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 33, n. 1, p. 141-145, 1995.
- DYKES, G. A., GEORNARAS, I., PAPATHANASOPOULOS, M. A., von HOLY, A. Plasmid profiles of *Listeria* species associated with poultry processing. *Food Microbiol.*, London, v. 11, n. 6, p. 519-523, 1994.
- EELES, R. A., STAMPS, A. C. Polymerase chain reaction (PCR): the technique and its applications. Landes, 1993. p. 4-11.
- EISENSTEIN, B. I. Polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 322, p. 178-182, 1990.
- ESTELA, L. A., SOFOS, J. N., FLORES, B. B. Bacteriophage typing of *Listeria monocytogenes* cultures isolated from seafoods. *J. Food Prot.*, Ames, v. 55, n. 1, p. 13-17, 1992.
- FACINELLI, B., VARALDO, P.E., TONI, M., CASOLARI, C., FABIO, U. Ignorance about *Listeria*. *Br. Med. J.*, London, v. 299, p. 738, 1989.
- FARBER, J. M. *Listeria monocytogenes* in fish products. *J. Food Prot.*, Ames, v. 54, n. 12, p. 922-924, 934, 1991.
- FARBER, J. M., ADDISON, C. J. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v. 77, n. 3, p. 242-250, 1994.
- FARBER, J. M., PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.*, Washington, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

- FDA places import alert on cooked seafood, surimi products. *Food Chem. News*, v. 35, n. 10, p. 51-52, 1993.
- FISTROVICI, E., COLLINS-THOMPSON, D. L. Use of plasmid profiles and restriction endonuclease digest in environmental studies of *Listeria* spp. from raw milk. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 10, p. 43-50, 1990.
- FREDERIKSEN, W. *Listeria* epidemiology in Denmark 1981-1990. In: INTERNATIONAL CONFERENCE *LISTERIA* AND FOOD SAFETY. Laval, 1991, Proceedings. Laval, ASEPT, 1991, p. 48-49.
- FUCHS, R. S., REILLY, P. J. A. The incidence and significance of *Listeria monocytogenes* in seafoods. In: HUSS, H. H., JAKOBSEN, M., LISTON, J. eds. Quality assurance in the fish industry. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 217-229.
- FUCHS, R. S., SIRVAS, S. Incidence of *Listeria monocytogenes* in acidified fish product, ceviche. *Letf. Appl. Microbiol.*, Oxford, v. 12, p. 88-90, 1991.
- FUCHS, R. S., SURENDRAN, P. K. Incidence of *Listeria* in tropical fish and fishery products. *Letf. Appl. Microbiol.*, Oxford, v. 9, p. 49-51, 1989.
- GABIS, D. A., FLOWERS, R. S., EVANSON, D., FAUST, R. E. A survey of 18 dry dairy product processing plant environments for *Salmonella*, *Listeria* and *Yersinia*. *J. Food Prot.*, Ames, v. 52, n. 2, p. 122-124, 1989.
- GEKAN, J. S., BANDLER, R., STARUSZKIEWICZ, W. F. Fresh and frozen shrimp: a profile of filth, microbiological contamination, and decomposition. *J. Food Prot.*, Ames, v. 57, n. 2, p. 154-158, 1994.
- GELLIN, B.G., BROOME, C.V. Listeriosis. *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v. 261, p. 1313-1320, 1989.
- GENIGEORGIS, C. A., DUTULESCU, D., FERNANDEZ GARAYZABAL, J. Prevalence of *Listeria* spp. in poultry meat at the supermarket and slaughterhouse level. *J. Food Prot.*, Ames, v. 52, n. 9, p. 618-624, 1989.
- GENIGEORGIS, C. A., OANCA, P., DUTULESCU, D. Prevalence of *Listeria* spp. in turkey meat at the supermarket and slaughterhouse level. *J. Food Prot.*, Ames, v. 53, n. 4, p. 282-288, 1990.

- GILBERT, R. J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in foods in the United Kingdom. In: INTERNATIONAL CONFERENCE *LISTERIA* AND FOOD SAFETY. Laval, 1991, Proceedings. Laval, ASEPT, 1991, p. 82-88.
- GOHIL, V. S., AHMED, M. A., DAVIES, R., ROBINSON, R. K. Incidence of *Listeria* spp. in retail foods in the United Arab Emirates. *J. Food Prot.*, Ames, v. 58, n. 1, p. 102-104, 1995.
- GRAVES, L. M., SWAMINATHAN, B., REEVES, M.W., HUNTER, S. B., WEAVER, R. E., PLIKAYTIS, B. D., SCHUCHAT, A. Comparison of ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis for subtyping of *Listeria monocytogenes*. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. 94. Las Vegas, 1994, Abstracts. Las Vegas, ASM, 1994. p.377 abstr. P-48.
- GRAVES, L. M., SWAMINATHAN, B., REEVES, M.W., WENGER, J. Ribosomal DNA fingerprinting of *Listeria monocytogenes* using a digoxigenin-labelled DNA probe. *Eur. J. Epidemiol.*, Roma, v. 7, n. 1, p. 77-86, 1991.
- GRAY, M. L., KILLINGER, A. H. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.*, Washington, v. 30, p. 309-382, 1966.
- GRIMONT, F., GRIMONT, P. A. D. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur/ Microbiol.*, Paris, v. 137B, p. 165-175, 1986.
- HANGARD-VIDAUD, N., NICOLAS, J. A., BOSGIRAUD, C., CORNUEJOLS, M. J. Recherche de *Listeria* chez les poissons d'eau douce. *Microbiol. Aliments Nutr.*, Chatenay-Malabry, v. 7, p. 421-423, 1989.
- HARSONO, K. D., KASPAR, C. W., LUCHANSKI, J. B. Comparison and genomic sizing of *Escherichia coli* O157:H7 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 59, n. 9, p. 3141-3144, 1993.
- HARTEMINK, R., GEORGSSON, F. Incidence of *Listeria* species in seafood and seafood salads. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 12, n. 2,3, p. 189-196, 1991.

- HARVEY, J., GILMOUR, A. Application of multilocus enzyme electrophoresis and restriction fragment length polymorphism analysis to the typing of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw milk, nondairy foods, and clinical and veterinary sources. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 60, n. 5, p. 1547-1553, 1994.
- HOFER, E., RIBEIRO, R. Ocorrência de espécies de *Listeria* em camarão industrializado. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 207-208, 1990.
- HOWARD, P. J., HARSONO, K. K., LUCHANSKY, J. B. Differentiation of *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria seeligeri* by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 58, n. 2, p. 709-712, 1992.
- HUDSON, J. A., MOTT, S. J., DELACY, K. M., EDRIDGE, A. L. Incidence and coincidence of *Listeria* spp., motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* on ready-to-eat fleshfoods. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 99-108, 1992.
- HUDSON, W. R., MEAD, G. C. *Listeria* contamination at a poultry processing plant. *Lett. Appl. Microbiol.*, Oxford, v. 9, p. 211-214, 1989.
- JEMMI, T. Actual knowledge of *Listeria* in meat and fish products. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg., Bern*, v. 31, p. 144-157, 1990.
- JEMMI, T., KEUSCH, A. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in freshwater fish farms and fish smoking plants. *Food Microbiol.*, London, v. 11, n. 4, p. 309-316, 1994.
- JENSEN, M. A., JACKSON, R., NOSZEK, J. C., PHILLIP, A., TICE, G. The application of a PCR-based assay for the detection of *Salmonella*. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. 94. Las Vegas, 1994, Abstracts. Las Vegas, ASM, 1994. p.369 abstr. P-2.
- JONES, D. Current classification of the genus *Listeria*. In: LISTERIA 1992. International Symposium on Problems of Listeriosis. 11. Copenhagen, 1992. Book of abstracts. Copenhagen: ISOPOL, 1992. p. 7-8.

- JORDENS, J. Z. Restriction enzyme analysis of chromosomal DNA and its application in epidemiological studies. *J. Hosp. Infect.*, v. 18, p. 432-437, 1991.
- KAMAT, A. S., NAIR, P. M. Incidence of *Listeria* species in Indian seafoods and meat. *J. Food Saf., Westport*, v. 14, n. 2, p. 117-130, 1994.
- KERR, K. G., BIRKENHEAD, D., SEALE, K., MAJOR, J., HAWKEY, P. M. Prevalence of *Listeria* spp. on the hands of food workers. *J. Food Prot., Ames*, v. 56, n. 6, p. 525-527, 1993.
- KLAUSNER, R. B., DONNELLY, C. W. Environmental sources of *Listeria* and *Yersinia* in Vermont dairy plants. *J. Food Prot., Ames*, v. 54, n. 8, p. 607-611, 1991.
- KOLSTAD, J., CAUGANT, D. A., RORVIK, L. M. Differentiation of *Listeria monocytogenes* isolates by using plasmid profiling and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol., Amsterdam*, v. 16, n. 3, p. 247-260, 1992.
- KOLSTAD, J., RORVIK, L. M., GRANUM, P. E. Characterization of plasmids from *Listeria* sp.. *Int. J. Food Microbiol., Amsterdam*, v. 12, p. 123-131, 1991.
- LAI, E., BIRREN, B. W., CLARK, S. M., SIMON, M. I., HOOD, L. Pulsed field electrophoresis. *Biotechniques, Natick*, v. 7, n. 1, p. 34-42, 1989.
- LAWRENCE, L. M., GILMOUR, A. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol., Washington*, v. 60, n. 12, p. 4600-4604, 1994.
- LAWRENCE, L. M., HARVEY, J., GILMOUR, A. Development of a random amplification of polymorphic DNA typing methods for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol., Washington*, v. 59, n. 9, p. 3117-3119, 1993.
- LENNON, D., LEWIS, B., MANTELL, C., BECROFT, D., DOVE, B., FARMER, K., TONKIN, S., YEATES, N., STAMP, R., MICKLESON, K. Epidemic perinatal listeriosis. *Pediatr. Infect. Dis., London*, v. 3, p. 30-34, 1984.

- LEW, A. E., DESMARCHELIER, P. M. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Listeria monocytogenes* and its application to epidemiological investigations. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 15, n. 3, 4, p. 347-356, 1992.
- LISTERIA* continues to be found in seafood. *Food Chem. News*, v. 35, n. 9, p. 19-20, 1993.
- MACGOWAN, A. P., O'DONAGHUE, K., NICHOLLS, S., McLAUCHLIN, J., BENNETT, P. M., REEVES, D. S. Typing of *Listeria* spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *J. Med. Microbiol.*, Edinburgh, v. 38, p. 322-327, 1993.
- MARQUET-van der MEE, N., AUDURIER, A. Proposals for optimization of the international phage typing system for *Listeria monocytogenes*: combined analysis of phage lytic spectrum and variability of typing results. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 61, n. 1, p. 303-309, 1995.
- MASLOW, J. N., MULLIGAN, M. E., ARBEIT, R. D. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago, v. 17, p. 153-164, 1993.
- MASUDA, T., IWAYA, M., MIURA, H., KOKUBO, Y., MARUYAMA, T. [Occurrence of *Listeria* species in fresh seafood]. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, Tokio, v. 33, n. 6, p. 599-602, 1992.
- MAYER, L. W. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v. 1, p. 228-243, 1988.
- MAZURIER, S. -I., AUDURIER, A., MARQUET-van-der-MEE, N., NOTERMANS, S., WERNARS, K. A comparative study of randomly amplified polymorphic DNA analysis and conventional phage typing for epidemiological studies of *Listeria monocytogenes* isolates. *Res. Microbiol.*, Paris, v. 143, n. 5, p. 507-512, 1992.
- MAZURIER, S. -I., WERNARS, K. Typing of *Listeria* strains by random amplification of polymorphic DNA. *Res. Microbiol.*, Paris, v. 143, p. 499-505, 1992.
- McCARTHY, S. A. Attachment of *Listeria monocytogenes* to chitin and resistance to biocides. *Food Technol.*, Chicago, v. 46, n. 12, p. 84-87, 1992.

- McCARTHY, S. A. *Listeria* in the environment. In: MILLER, A. J., SMITH, J. L., SOMKUTI, G. A. eds. Foodborne listeriosis. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 25-29.
- McCARTHY, S. A., MOTES, M. L., McPHEARSON, M. Recovery of heat-stressed *Listeria monocytogenes* from experimentally and naturally contaminated shrimp. *J. Food Prot.*, Ames, v. 53, n. 1, p. 22-25, 1990.
- McLAUCHLIN, J. A., AUDURIER, A., TAYLOR, A. G. The evaluation of phage-typing system for *Listeria monocytogenes* for use in epidemiological studies. *J. Med. Microbiol.*, Edinburgh, v. 22, p. 357-365, 1986.
- MEAT industry research shows *Listeria* widespread control difficult. *Food Chem. News*, v. 29, n. 17, p. 27-29, 1987.
- MESQUITA, A. J. Bactérias do gênero *Listeria* em carne e água residuária de lavagem de carcaça de um matadouro frigorífico e em carne bovina moída comercializada na cidade de Goiânia, Goiás. São Paulo, 1991. (Tese de doutoramento - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo).
- MOORE, M. A., DATTA, A. R. DNA fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Food Microbiol.*, London, v. 11, p. 31-38, 1994.
- MOORE, M. A., KHAMBATI, F. M., DATTA, A. R. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains by pulsed-field gel electrophoresis. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. 92. New Orleans, 1992, Abstracts. New Orleans, ASM, 1992. p.451 abstr. C-183.
- MOTES Jr., M. L. Incidence of *Listeria* spp in shrimp, oysters, and estuarine waters. *J. Food Prot.*, Ames, v. 54, n. 3, p. 170-173, 1991.
- MULLIS, K. B., FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.*, New York, v. 155, p. 335-350, 1987.
- MUSSELS linked with deaths in New Zealand. *Food Chem. News*, v. 35, n. 11, p. 19, 1993.

- NAKAJIMA, H., ITOH, K. -I., ARAKAWA, E., INOUE, M., MORI, T., WATANABE, H. Degradation of polymerase chain reaction (PCR) product by heat-stable deoxyribonuclease (DNase) produced from *Yersinia enterocolitica*. *Microbiol. Immunol.*, Tokyo, v. 38, n. 2, p. 153-156, 1994.
- NOAH, C. W., PEREZ, J. C., RAMOS, N. C., MCKEE, C. R., GIPSON, V. Detection of *Listeria* spp in naturally contaminated seafoods using four enrichment procedures. *J. Food Prot.*, Ames, v. 54, n. 3, p. 174-177, 1991.
- NOCERA, D., BANNERMAN, E., ROCOURT, J., JATON-OGAY, K., BILLE, J. Characterization by DNA restriction endonuclease analysis of *Listeria monocytogenes* strains related to the Swiss epidemic of listeriosis. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 28, p. 2259-2263, 1990.
- NORRUNG, B., SKOVGAARD, N. Application of multilocus enzyme electrophoresis in studies of the epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Denmark. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 59, n. 9, p. 2817-2822, 1993.
- ORTEL, S. Phage-typing of *Listeria*. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 8, p. 241-243, 1989.
- PALUMBO, S. A., WILLIAMS, A. C. Effect of temperature, relative humidity and suspending menstrua on the resistance of *Listeria monocytogenes* to drying. *J. Food Prot.*, Ames, v. 53, p. 377-381, 1990.
- PEREIRA, M. L., BUCHRIESER, C., BROSCHE, R., CATIMEL, B., ROCOURT, J., HOFER, E. Characterization of Brazilian *Listeria monocytogenes* strains using DNA macrorestriction patterns. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 144-148, 1994.
- PÉREZ-DÍAZ, J. C., VICENTE, M. F., BAQUERO, F. Plasmids in *Listeria*. *Plasmid*, New York, v. 8, p. 112-118, 1982.
- PIMENTA, F. C. *Listeria monocytogenes*: ribotipagem e estudo de fatores de virulência de amostras isoladas a partir de alimentos de origem animal. São Paulo, 1995 (Dissertação de mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo).

- POWELL, N. G., THRELFALL, E. J., CHART, H., ROWE, B. Subdivision of *Salmonella enteritidis* PT4 by pulsed-field gel electrophoresis: potential for epidemiological surveillance. *Microbiol. Lett.*, v. 119, p. 193-198, 1994.
- RAVOMANANA, D., RICHARD, N., ROSEC, J. P. *Listeria* spp. dans des produits alimentaires - etude comparative de differents protocoles de recherche et d'une méthode rapide par hybridation nucleique. *Microbiol. Aliments Nutr.*, Chatenay-Malabry, v. 11, p. 57-70, 1993.
- RECOMENDATIONS by The National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods: *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 14, n. 3,4, p. 185-246, 1991.
- RIEDO, F. X., PINNER, R. W., TOSCA, M., CARTTER, M. L., GRAVES, L. M., REAVES, 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.*, Chicago, v. 170, p. 693-696, 1994.
- RIEDO, F. X., PINNER, R. W., TOSCA, M., CARTTER, M. L., GRAVES, L. M., REAVES, M. W., PLIKAYTIS, B. D., BROOME, C. V. A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. In: INTERSCIENCE CONFERENCE ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. 30. Atlanta, 1990. Program Abstract. Atlanta, 1990. p. 248 abstr. 972.
- RORVIK, L. M., YNDESTAD, M. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 97-104, 1991.
- ROSSEN, L., HOLMSTROM, K., OLSEN, J. E., RASMUSSEN, O. F. A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 14, p. 145-151, 1991.
- RYSER, E. T., MARTH, E. H. *Listeria*, listeriosis and food safety. Marcel Dekker, New York, 1991, 632p.
- RYU, C. H., IGIMI, S., INOUSE, S., KUMAGAI, S. The incidence of *Listeria* species in retail foods in Japan. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 157-160, 1992.

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T., eds. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v. 1, p. 6.12 - 6.15.
- SEELIGER, H. P. R., JONES, D. Genus *Listeria*. In: Sneath P. H. A., ed Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams, Wilkins, 1986, v. 2, p. 1235-1245.
- SELANDER, R. K., CAUGANT, D. A., OCHMAN, H., MUSSER, J. M., GILMOUR, M. N., WHITTAM, T. S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 51, p. 873-884, 1986.
- SHERIDAN, J. J., DUFFY, G., McDOWELL, D. A., BLAIR, I. S. The occurrence and initial numbers of *Listeria* in Irish meat and fish products and the recovery of injured cells from frozen products. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 22, p. 105-113, 1994.
- SMOKED salmon recalled because of *Listeria*. *Food Chem. News*, v. 23, p. 26, 1989.
- SNELLING, A. M., KERR, G., HERITAGE, J. The survival of *Listeria monocytogenes* on fingertips and factors affecting elimination of the organism by hand washing and disinfection. *J. Food Prot.*, Ames, v. 54, p. 343-348, 1991.
- SOLDATI, L., PIFFARETTI, J. C. Molecular typing of *Shigella* strains using pulsed field gel electrophoresis and genome hybridization with insertion sequences. *Res. Microbiol.*, Paris, v. 142, p. 489-498, 1991.
- SZABO, E. A., DESMARCHELIER, P. M. A comparative study of clinical and food isolates of *Listeria monocytogenes* and related species. *Epidemiol. Infect.*, Cambridge, v. 105, p. 245-254, 1990.
- TENOVER, F. C. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v. 1, p. 82-101, 1988.
- THOMAS, E. J., KING, R. K., BURCHAK, J., GANNON, V. P. Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 57, n. 9, p. 2576-2580, 1991.

- TOMPKINS, L. S. The use of molecular methods in infectious diseases. *N. Engl. J. Med.*, Boston, Oct. 29, p. 1290-1297, 1992.
- TOMPKINS, L. S., TROUP, N., LABIGNE-ROUSSEL, A., COHEN, M. L. Cloned, random chromosomal sequences as probes to identify *Salmonella* species. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v. 154, p. 156-162, 1986.
- VAN DEN ELZEN, A. M. G., SNIJDERS, J. M. A. Critical points in meat production lines regarding the introduction of *Listeria monocytogenes*. *Vet. Q.*, The Hage, v. 15, n. 4, p. 143-145, 1993.
- VERSALOVIC, J., WOODS Jr., C. R., GEORGHIOU, P. R., HAMILL, R. J., LUPSKI, J. R. DNA-based identification and epidemiologic typing of bacterial pathogens. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, Chicago, v. 117, p. 1088-1098, 1993.
- VICENTE, M. F., PÉREZ-DIAZ, J. C., AMILS, R., BAQUERO, F., MARIN, I. Towards a physical map of *Listeria* chromosome: the pulsed-field electrophoresis approach. *Acta Microbiol. Hung.*, Budapest, v. 36, n. 2-3, p. 193-197, 1989.
- VILDE, J. L., HUCHON, A., MIGNON, M., SCHERRER, H., BERGOGNE-BEREZIN, E., PIERRE, J. Infection d'allure typique due à *Listeria monocytogenes* après absorption d'huître. *Nouv. Presse Méd.*, Paris, v. 9, p. 3281, 1980.
- WALKER, R. L., JENSEN, L. H., KINDE, H., ALEXANDER, A. V., OWENS, L. S. Environmental survey for *Listeria* species in frozen milk product plants in California. *J. Food Prot.*, Ames, v. 54, n. 3, p. 178-182, 1991.
- WANG, G., WHITTAM, T. S., BERG, C. M., BERG, D. E. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic Acids Res.*, London, v. 21, n. 25, p. 5930-5933, 1993.
- WARBURTON, D. W., FARBER, J. M., BABIUK, T. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: CANADA. Health and Welfare. Compendium of analytical methods: laboratory procedures of microbiological analysis of foods. Ottawa: Polyscience, 1991. v. 3 [MFHPB 30].
- WARD, D. R., HACKNEY, C. R., eds. Microbiology of marine food products. New York: AVI, 1991. 450p.

- WEAGANT, S. D., SADO, P. N., COLBURN, K. G., TORKELSON, J. D., STANLEY, F. A., KRANE, M. H., SHIELDS, S. C., THAYER, C. F. The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products. *J. Food Prot.*, Ames, v. 51, n. 8, p. 655-657, 1988.
- WELSH, J., McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, London, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.
- WENGER, J. D., SWAMINATHAN, B., HAYES, P. S., GREEN, S. S., PRATT, M., PINNER, R. W., SCHUCHAT, A., BROOME, C. V. *Listeria monocytogenes* contamination of turkey franks: evaluation of a production facility. *J. Food Prot.*, Ames, v. 53, n. 12, p. 1015-1019, 1990.
- WERNARS, K., HEUVELMAN, C. J., CHAKRABORTY, T., NOTERMANS, S. H. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, n. 70, v. 2, p. 121-126, 1991.
- WESLEY, I. V., ASHTON, F. Restriction enzyme analysis of *Listeria monocytogenes* strains associated with food-borne epidemics. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 57, p. 969-975, 1991.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, London, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.
- WONG, H. -C., CHAO, W. L., LEE, S. J. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* in foods available in Taiwan. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 3, p. 101-104, 1990.
- YAN, W.; PETERKIN, P. I., FARBER, J. M. Epidemiologic analysis of *Listeria monocytogenes* clinical and food isolates by pulsed-field gel electrophoresis. In: JOINT ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND THE CANADIAN SOCIETY OF MICROBIOLOGISTS. Toronto, 1993. Abstracts. Toronto, 1993. p. 53 abstr. P-100.
- ZOTTOLA, E. A., SMITH, L. B. The microbiology of foodborne disease outbreaks: an update. *J. Food Saf.*, Westport, v. 11, p. 13-29, 1991.

7. Resumo

A ocorrência de *Listeria monocytogenes* em alimentos vem sendo estudada desde o início dos anos 80, após seu envolvimento em vários surtos de doença de origem alimentar. Os frutos do mar são o grupo de alimentos que despertou menor atenção por parte dos pesquisadores, apesar de terem sido envolvidos em casos esporádicos de listeriose e mesmo em surtos da doença. A amostragem ambiental e de produto, ao longo de uma linha de processamento é uma forma de localizar áreas relacionadas à contaminação do alimento permitindo que sejam feitas correções para evitar a produção de bens que exponham o consumidor a doenças. Com a finalidade de avaliar a contribuição da matéria prima e fatores ambientais na ocorrência e distribuição de *L. monocytogenes* em uma indústria processadora de pescados, e mais especificamente, numa linha processadora de camarão rosa (*Penaeus brasiliensis*), é que desenvolveu-se a presente pesquisa. Também buscou-se determinar as diversidades antigênica e genética das cepas de *L. monocytogenes* isoladas, e correlacionar esta diversidade à sua distribuição na indústria. Assim, um total de 363 amostras coletadas em diferentes pontos de uma linha de processamento de camarão rosa foram examinadas para a presença de *L. monocytogenes*, empregando-se a metodologia recomendada pelo Health Protection Branch, do Canadá. A seguir, 115 cepas de *L. monocytogenes* representativas das amostras positivas para o microrganismo foram sorotipadas e o polimorfismo do seu DNA cromossômico avaliado com o auxílio dos métodos RAPD ("random amplified polymorphic DNA") e PFGE ("pulsed-field

gel electrophoresis"). Um grupo de 25 cepas foi também submetido a sorotipagem completa, fagotipagem e ribotipagem pelo sistema RiboPrint da DuPont. Do total de amostras examinadas, 64 (17,6%) apresentaram-se contaminadas por *L. monocytogenes*. As amostras ambientais apresentaram 25,0% de positividade (14 positivas/56 examinadas). As amostras de utensílios 24,2% (8/33) e as de água 23,8% (5/21). As amostras de camarão apresentaram 18,0% de contaminação (32/178) e as de manipuladores 7,6% (5/66). Nenhuma das amostras de gelo foi positiva para *L. monocytogenes*. Durante o processamento observou-se um aumento na percentagem de amostras positivas para *L. monocytogenes*, chegando esta percentagem a 35,0% em algumas etapas, mas reduzindo-se a 16,0% no produto final. O perfil composto gerado pela combinação dos resultados obtidos com a tipagem molecular das 115 cepas de *L. monocytogenes* selecionadas, permitiu a sua divisão em 24 grupos, de acordo com seus perfis de DNA. A sorotipagem das 25 cepas selecionadas mostrou que 11 pertenciam ao sorovar 4b, 7 ao sorovar 1/2b, 2 ao sorovar 1/2c e 5 ao sorovar 1/2a. A fagotipagem permitiu que elas fossem divididas em 7 fagovares, sendo que a maior parte das cepas do sorovar 4b (81,8%) não foi fagotipável. A ribotipagem destas 25 cepas originou 6 RiboGroups™. Os resultados indicaram que cepas de *L. monocytogenes* de origem ambiental pertenciam a perfis compostos exclusivos para o ambiente, enquanto que cepas provenientes da água e de utensílios possuíam um perfil composto em comum. Amostras de camarão coletadas nas diversas etapas do processamento apresentaram *L. monocytogenes* com pelo menos um perfil composto em comum, perfil este também presente nas cepas isoladas das mãos dos manipuladores.

8. Summary

The importance of seafood in the spread of foodborne pathogens is well known, however, until the last few years, little attention has been paid to the role of seafood in disseminating *L. monocytogenes*. Two foodborne listeriosis outbreaks have been linked to the consumption of seafood. *L. monocytogenes* and other *Listeria* species have been isolated from different types of raw or processed seafood, but the main source of contamination is unknown. For this reason, it is important to monitor the potential sources of this pathogen in food processing plants, in order to minimize product contamination. The aim of this study was to evaluate the contribution of raw material and environment in the occurrence and distribution of *L. monocytogenes* in shrimp (*Penaeus brasiliensis*) processing plant. The antigenic and genetic diversities of *L. monocytogenes* strains were also determined. A total of 363 samples, collected in different areas of a shrimp processing plant in Santos, SP, were examined using the methodology recommended by the Health Protection Branch, Canada. One hundred and fifteen strains of *L. monocytogenes* representing the *L. monocytogenes* positive samples were first serotyped and then sub-typed by molecular typing (RAPD and PFGE). A group of 25 strains were also ribotyped and phage-typed. *L. monocytogenes* was isolated from 64 (17.6%) of the total samples analysed. Environmental samples showed the highest positivity rate (25%) followed by utensils (24.2%) and water (23.8%) samples. Shrimp samples presented 18% of positivity for *L. monocytogenes* while food handlers samples presented 7.6%. None of the ice samples was positive for the microorganism. When the composite profile from both (RAPD-PFGE)

methods was generated, the 115 strains could be separated in 24 groups, according to their DNA pattern. The results indicated that environmental strains of *L. monocytogenes* all fell into composite profile groupings unique to the environment, while strains from both water and utensils shared another composite profile group. *L. monocytogenes* fresh shrimp isolates belonging to one profile group, were found in the different areas of the processing line. This same latter group was also present in food handlers from the processing and packaging areas of the plant.

Correções

Pag. 54

3.2.2.1. Enriquecimento primário

2ª linha - Onde lê-se "... produto com **25 ml** de caldo de enriquecimento ..." leia-se "...produto com **225 ml** de caldo de enriquecimento ..."

Pag. 59

2º parágrafo - Onde lê-se "Os tubos Eppendorf foram aquecidos a **96°C** por 6 minutos..." leia-se "Os tubos Eppendorf foram aquecidos a **94°C** por 6 minutos...".